Santé environnement

Enseignements de la collecte biologique en maternité de l'étude pilote Elfe

Octobre 2007

Rapport final

elfe
Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance

INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE

Sommaire

Abréviations 2
Résumé 3

1. Contexte de l'étude 4

2. Objectifs du pilote 4

3. Méthodes 4

3.1 Population étudiée 4

3.2 Prélèvements biologiques envisagés et modalités de recueil 5

3.3 Mise en œuvre de l'étude 7

3.4 Dosages biologiques et rendu des résultats 8

4. Résultats 9

4.1 Taux de participation et de réalisation de la collecte biologique dans Elfe 9

4.2 Volumes recueillis par type de prélèvement 12

4.3 Transport et traitement des échantillons 17

4.4 Analyse de la qualité des prélèvements 19

4.5 Dosages biologiques : plomb, cytomégalovirus et toxoplasmose 23

5. Difficultés rencontrées 26

5.1 Dossiers d'autorisation 26

5.2 Mise en place du partenariat 26

5.3 Recrutement des maternités et des enquêteurs en maternité 26

5.4 Envoi du matériel aux maternités 27

5.5 Formation des sages-femmes 27

5.6 Recueil des prélèvements 27

5.7 Transport des prélèvements 29

5.8 Traitement des prélèvements 29

5.9 Traitement informatique des données 29

5.10 Destruction des prélèvements 29

6. Enseignements pour l'étude nationale 30

6.1 Enseignements techniques et logistiques 30

6.2 Enseignements organisationnels 31

6.3 Enseignements scientifiques 32

7. Conclusion 39

8. Perspectives 39

Références bibliographiques 41

Annexes 43

Enseignements de la collecte biologique en maternité de l'étude pilote Elfe

Octobre 2007

Auteurs

Vandentorren S, Oleko A, Département santé environnement, Institut de veille sanitaire (InVS)

Participation au pilote sur les aspects des prélèvements biologiques

Équipe Elfe, InVS :
- Coordinatrice : Stéphanie Vandentorren
- Monitrice d'étude : Amivi Oleko
- Statisticiennes : Hélène Sarter, Nicolas Pinkos
- Gestionnaire : Sorya Som

Soutien financier et logistique, InVS : Karine De Proft, Laurent Rivas
Épidémiologistes, InVS : Véronique Goulet, Denise Antona, Anne Etchevers, Philippe Bretin
Partenaires Établissement français du sang (EFS) : Isabelle Desbois, Claire Gerdil, Coraline Gadras
Partenaires des laboratoires de référence : les Centres nationaux de référence (CNR) de cytomégalovirus de Paris : Marianne Leruez-Ville ; de Limoges : Sophie Alain ainsi que le CNR de toxoplasmose de Reims : Isabelle Villena

Constitution de l'équipe projet Elfe lors des études pilotes

Direction du projet : Henri Leridon
Coordination sectorielle : Stéphanie Vandentorren, Corinne Bois, Claudine Pirus
Monitorage : Amivi Oleko, Cécile Lefèvre
Statistique : Hélène Sarter
Informatique : Arnaud Dorléans
Assistantes : Christine Gonzalez, Marie-Danielle Bailly
Assistante/gestionnaire : Sorya Som
Avec le soutien logistique de l'Institut national d'études démographiques

Liste des maternités participantes

Hôpital privé de Seine-Saint-Denis (93), Polyclinique Vauban (93), Clinique du Vert Galant (93), Hôpital européen de Paris Roseraie (93), Maternité des Lilas (93), Hôpital Jean Verdier (93), Hôpital Robert Ballanger (93) Centre hospitalier (CH) de Saint-Denis (93), Clinique Pasteur (07), Clinique Saint-Vincent-de-Paul (38), Clinique Saint-Charles-Roussillon (38), CH privé de la Loire (38), Clinique Belledonne (38), CH du Vals d'Ardèche (07), CH de Bourgoin-Jallieu (38), Clinique mutualiste des Eaux claires (38), CH de Saint-Chamond (42), CH de Montbrison (42), CH d'Aix-les-Bains (73), CH de Bourg-Saint-Maurice (73), CH de Vienne Lucien Hussel (38), CH de Voiron (38), CH de Roanne (42), CH de Firminy (42), CH d'Albertville (73), CHU de Grenoble (38), CHU Saint-Étienne Hôpital Nord (42), CH de Chambéry (73).

Remerciements

L'équipe projet Elfe remercie toutes les sages-femmes enquêtrices ayant participé à ce pilote et particulièrement les sages-femmes de bloc des maternités ainsi que toutes les mamans et leurs bébés !

Les auteurs remercient les personnes ayant attentivement relu ce rapport, Marie-Aline Charles (Institut national de la santé et de la recherche médicale), Frédéric de Bels et Georges Salines (InVS).

Abréviations

ADN	Acide désoxyriboNucléique
CCTIRS	Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé
CH	Centre hospitalier
CHU	Centre hospitalier universitaire
CMV	Cytomégalovirus
Cnil	Commission nationale de l'informatique et des libertés
CNR	Centre national de référence
CPP	Comité de protection des personnes
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EFS	Établissement français du sang
Elfe	Étude longitudinale française depuis l'enfance
GB	Globules blancs
GR	Globules rouges
OMICS	Terme générique faisant référence à "genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics"
PCB	Polychlorobiphényle
PMI	Protection maternelle infantile
Pop	Polluants organiques persistants
RR	Risque relatif
SF	Sage-femme

Résumé

Beaucoup de facteurs agissant dans la petite enfance peuvent influencer la santé future des enfants, que ce soient des expositions *in utero* ou périnatales aux polluants environnementaux ou bien à des facteurs nutritionnels ou infectieux. Un des objectifs de la cohorte Elfe (Étude longitudinale française depuis l'enfance) est d'analyser ces expositions et d'évaluer leur impact sur la santé de 20 000 enfants, nés en 2011 et suivis jusqu'à l'âge adulte. Dans une telle cohorte de naissance, la collecte biologique en maternité permet de déterminer ces facteurs et représente une étape cruciale qui doit être testée. Une étude pilote a été réalisée en octobre 2007 en Rhône-Alpes et Seine-Saint-Denis sur 571 naissances, montrant un taux d'acceptation globale de 55 % et parmi ceux-ci un taux de 80 % de réalisation des prélèvements biologiques en maternité sur le sang de cordon, le lait maternel, les urines et les cheveux de la mère. Les échantillons ont été recueillis à la maternité par les sages-femmes et transportés deux fois par jour à +4 °C jusqu'aux deux centres EFS (Établissement français du sang), où ils ont été aliquotés et stockés à -80 °C. Ce pilote a permis de valider les procédures de collecte et de mise en biobanque des échantillons et de tirer des enseignements logistiques, organisationnels et scientifiques pour dimensionner l'étude au niveau national. Au niveau logistique, les enseignements concernent le choix du matériel à harmoniser avec les contraintes du partenaire EFS, l'amélioration des consignes auprès des sages-femmes (notamment pour diminuer la coagulation des tubes), l'optimisation des règles d'aliquotage et du transport. Les enseignements organisationnels qui en ont été tirés concernent la mise en place d'une coordination régionale ; le recours à un prestataire (notamment pour l'envoi de matériel) ; la rémunération des sages-femmes et la compensation pour le service impliqué sur le terrain pour la mise à disposition du personnel ; et enfin, l'activation du réseau EFS en amont. En termes scientifiques, l'étude permet de conclure à la nécessité de réaliser la collecte sur 10 000 sujets ; d'optimiser le plan de sondage (tirage proportionnel à la taille des maternités, tenant compte secondairement de la proximité avec les centres de traitement des échantillons) ; et enfin, de mettre en biothèque 40 % des échantillons.

L'étude a permis de sélectionner les matrices pertinentes de façon quantitative (volumes recueillis, nombre de sujets) et qualitative (premiers dosages) sur le sang de cordon, les urines maternelles, les cheveux et le lait en maternité, d'en abandonner d'autres (lait à domicile) ou de proposer d'autres pistes (sang veineux maternel, méconium et tissu placentaire). Les échantillons seront utilisés à des fins de biosurveillance (dosages immédiats) ou de recherche (dosages ultérieurs), après avis d'un comité consultatif constitué à cet effet. Enfin, les dosages de ces échantillons apporteront également des informations scientifiques, notamment sur l'imprégnation des mères aux polluants émergents, ce qui guidera les choix de sélection et la hiérarchisation des biomarqueurs prioritaires qu'il sera pertinent de prendre en compte au niveau national sur le volet périnatal de biosurveillance du plan national.

1. Contexte de l'étude

L'étude Elfe a pour objectif d'analyser le développement physique, psychologique et social de l'enfant, à partir d'une cohorte représentative de 20 000 enfants nés en France en 2011, en prenant en compte l'impact des facteurs familiaux, sociaux, scolaires, comportementaux, environnementaux, sanitaires ou nutritionnels et leurs interactions [1].

Aucune cohorte d'enfants de taille aussi conséquente et aux objectifs multiples (développement moteur et cognitif, santé, éducation, environnement familial et social…) n'a jamais été lancée en France, mais des cohortes mères-enfants de taille plus modeste existent depuis plusieurs années [2,3]. La nécessité d'une telle étude s'impose de plus en plus notamment en raison de la complexité des enchaînements de causes et de situations, des évolutions récentes de nombreux aspects de l'environnement des enfants, et des spécificités du contexte français. Il importe que la cohorte soit construite sur une base représentative de la population générale à la fois pour les besoins de la recherche sociodémographique et pour les mesures de prévalence épidémiologique [4].

La dimension pluridisciplinaire de ce projet par la large gamme de thématiques proposées (étude des facteurs familiaux, sociaux, scolaires, comportementaux, environnementaux, sanitaires et nutritionnels) est une approche pionnière dont l'acceptabilité doit être testée. Le nombre et la diversité des partenaires requièrent une bonne coordination pour la mise en œuvre du projet qu'il est également utile d'évaluer. Un préalable indispensable pour une étude d'une telle ampleur est donc la réalisation d'études pilotes.

2. Objectifs du pilote

Un premier pilote a eu lieu en avril 2007 en Bourgogne et Picardie avec pour objectif de tester la faisabilité et l'acceptabilité de l'étude, mais cette phase n'a pas inclus la collecte biologique. Les résultats ont montré une participation moyenne de 60 %, avec de grandes disparités selon les maternités. La première phase de recueil en maternité a entraîné une charge de travail conséquente sur le personnel qui a néanmoins bien adhéré à l'étude. Ce second pilote d'octobre 2007 a pour objectif de tester l'ensemble du processus dont celui de la collecte biologique.

L'objectif principal de l'étude pilote est d'évaluer l'organisation logistique et administrative, l'acceptabilité de l'étude, la faisabilité du recueil des données, notamment les prélèvements biologiques, pour l'ensemble des phases de la collecte, y compris l'analyse des dosages. Cet objectif principal se décline en différentes étapes pour tirer des enseignements à partir des difficultés rencontrées à chacune d'entre elles, c'est-à-dire :

- tester la participation des femmes à l'étude et la réalisation de chaque matrice de prélèvement biologique en conditions réelles ;
- tester les volumes recueillis par rapport aux volumes attendus ;
- évaluer les temps de transport et le mode de traitement des échantillons ;
- analyser la qualité des prélèvements.

Un objectif secondaire est de constituer une cohorte pilote afin de tester le suivi de l'observation pour anticiper la mise en œuvre de l'étude en taille réelle.

Un autre objectif est l'analyse descriptive de ces premières données, donnant quelques indications sur la distribution de certaines variables dans la population et les seuils attendus de certains biomarqueurs. (Cet objectif fera l'objet d'un autre rapport : "Enseignements des dosages des biomarqueurs environnementaux en maternité de l'étude pilote Elfe").

3. Méthodes

3.1 Population étudiée

Les départements pilotes, choisis essentiellement pour des raisons de diversités régionales (en termes de population et d'urbanisation), ont été la Seine-Saint-Denis (93) et quatre départements de Rhône-Alpes : l'Ardèche (07), l'Isère (38), la Loire (42) et la Savoie (73). L'étude a eu lieu dans toutes les maternités publiques et privées de ces départements.

Les critères d'inclusion ont été :

- les enfants nés les 1er, 2, 3 et 4 octobre 2007, à partir de 22 semaines d'aménorrhée ou un poids de naissance de 500 grammes ;
- ceux pour lesquels l'issue de la grossesse a été au plus des jumeaux vivants (les naissances multiples de plus de deux enfants n'ont donc pas été prises en compte dans l'étude) ;
- ceux pour lesquels la mère, et si le contact a été possible en maternité avec le père, a (ont) été capable(s) de donner un consentement éclairé (mère et/ou père majeur(e)(s) et bénéficiant de tous leurs droits, ou pour lesquels la personne physique ou morale responsable de l'enfant a été en mesure de signifier un accord de consentement écrit. Les enfants nés de mères mineures au jour de l'entretien n'ont donc pas été inclus.

Au jour du lancement du pilote, 38 maternités ont été recensées dans les départements choisis pour l'étude pilote. Le nombre d'enfants à naître pendant la période d'inclusion a été estimé à environ 550 (nombre estimé à partir des naissances de 2004).

3.2 Prélèvements biologiques envisagés et modalités de recueil

3.2.1 Prélèvements envisagés et objectifs scientifiques

Le choix de constituer une cohorte de nouveau-nés implique de ne pas suivre les femmes durant leur grossesse de façon prospective. Or, le fœtus est particulièrement sensible durant cette période *in utero* aux substances auxquelles il est exposé (que ce soit des expositions chimiques, biologiques ou encore des nutriments). Le moment de la naissance (et donc la collecte de prélèvements biologiques en maternité) est donc le principal centre d'intérêt pour recueillir le maximum d'informations concernant les expositions environnementales au sens large (substances chimiques, nutrition) *in utero*. Le prélèvement du sang du cordon est un moyen de récupérer du sang du nouveau-né de façon non invasive et de recueillir différentes données permettant d'évaluer le capital "santé" à la naissance, qui aura des répercussions sur l'évolution de l'enfant. Des corrélations seront recherchées entre ces données (statut obtenu lors de l'étape fœtale) et l'apparition de pathologies dans l'enfance, l'adolescence et à l'âge adulte (syndrome métabolique, diabète, maladies cardiovasculaires, maladies infectieuses, asthme, allergies…). Sur le plan nutritionnel, un déséquilibre dans les apports en macronutriments ou en micronutriments par excès (d'apport calorique, de graisses polyinsaturées ou de fer) ou bien par défaut (d'antioxydants en particulier de vitamines A, C et E, de sélénium et de zinc ou d'autres micronutriments comme l'acide folique ou le fer) peut favoriser l'apparition de complications de la grossesse et retentir sur le développement fœtal et à long terme [5-9]. L'analyse de ces paramètres dès la naissance permettra d'obtenir un profil de base avant l'apparition d'éventuelles perturbations [10,11]. Sur le plan chimique, il est communément admis que les toxiques auxquels l'enfant est soumis dès son plus jeune âge et même dès sa conception peuvent perturber son bon développement aussi bien sur le plan psychomoteur (substances neurotoxiques) qu'au niveau de son développement sexuel (substances reprotoxiques, perturbateurs endocriniens). La plupart des substances suspectées comme pouvant favoriser ces troubles sont retrouvées dans l'organisme de la mère, et peuvent passer au travers du placenta ou dans le lait maternel, et peuvent également être présentes au cours de l'enfance. Certaines de ces substances sont retrouvées de façon chronique dans l'organisme, soit parce qu'elles s'éliminent très lentement et s'accumulent dans l'organisme au cours du temps, soit parce qu'elles sont absorbées régulièrement bien qu'éliminées rapidement.

Non seulement on ne connaît pas en France les niveaux d'exposition des nourrissons et des enfants à ces substances, mais de façon plus générale, on ne connaît pas bien les relations entre les différentes matrices (corrélations des concentrations de substances observées dans le sang de la mère et du cordon, sang de la mère et du lait, sang et urine). Par ailleurs, il semble indispensable d'avoir une vision large et si possible intégrée des différentes expositions et ne pas se contenter d'étudier une seule substance parmi les substances ayant le même type d'effet ; cela répond d'ailleurs à la demande de la commission européenne dans le cadre du "Plan européen santé environnement" qui encourage les approches intégrées, ainsi que la recherche des effets neurotoxiques et reprotoxiques chez les enfants. La notion de mélange d'exposition sera appréhendée par le recueil d'un éventail de contaminants dans le sang et autres échantillons biologiques (à la maternité, à 3 ans et à 6 ans). De nouveaux biomarqueurs d'exposition, d'effets et de susceptibilité seront développés pour appréhender les risques neurotoxiques et de perturbations endocriniennes. L'identification de gènes de susceptibilité individuelle et la compréhension des mécanismes d'interaction entre gènes et facteurs environnementaux pourront être ainsi abordées.

Les demandes des chercheurs sur les prélèvements biologiques dans la cohorte concernent essentiellement les aspects toxiques, nutritionnels et infectieux ; ainsi que des marqueurs inflammatoires et d'empreinte métabolomique [12] :

- concernant les aspects toxiques, les dosages envisagés sont les polluants environnementaux connus (plomb, mercure, certains pesticides) dans le sang de cordon ; ou plus émergents (phtalates, certains pesticides, bisphénol A, organoétains) dans les urines maternelles (ainsi que la cotinine et la créatinine) et des polluants organiques persistants (Pop) (dioxines, furanes, polychlorobiphényles (PCBs), retardateurs de flamme bromés et perfluorés) dans le lait maternel mature. Par ailleurs, certains OMICS (metabolics, proteomics, genomics qui sont des indicateurs d'effets précoces) seront également dosés dans le sang de cordon ;
- concernant les aspects nutritionnels, on prévoit de mesurer les nutriments (antioxydants, vitamine D, fer, sélénium, profil lipidique et acides gras) ;
- les marqueurs d'inflammation et les Immunoglobulines E sont également envisagés ;
- enfin, les aspects infectieux concernent le cytomégalovirus, la toxoplasmose qui ont des implications sur la croissance et le développement ultérieur de l'enfant (neurotoxicité), seront analysés.

La collecte en maternité a été testée en octobre 2007. Une note explicative a été remise à la maternité aux mères pour leur expliquer les raisons de ces prélèvements biologiques dans la cohorte Elfe (annexe 1).

3.2.2 Modalités de recueil

- **Le sang du cordon** a été prélevé par la sage-femme présente à l'accouchement en salle de naissance selon différentes méthodes pour tester la méthode optimale : utilisation de la seringue (en Rhône-Alpes), ou par vacutainer (département de la Seine-Saint-Denis) ou encore par écoulement direct dans le tube.
- **Les urines de la mère** ont été recueillies à la maternité par les sages-femmes de bloc à l'admission.
- **Les cheveux de la mère** ont été prélevés en suite de couches par les sages-femmes enquêtrices. La mèche de cheveux était coupée en région occipitale et agrafée sur une feuille bristol (annexe 2bis).
- **Le lait maternel à la maternité** a été recueilli en suite de couches à J2-J3.
- **Le lait maternel mature au domicile** (annexe 2) a été recueilli 1 à 2 mois plus tard par la maman.

Remarque : les prélèvements ont fait l'objet d'un consentement écrit, consentement présenté par la sage-femme enquêtrice et renvoyé à l'attention du Dr Stéphanie Vandentorren (coordinatrice santé environnement pour Elfe). Les dosages dans le sang du cordon du plomb et du cytomégalovirus (CMV) sont susceptibles d'entraîner une prise en charge spécifique s'ils sont positifs sous réserve du consentement spécifique de la mère à ce sujet et seront donc réalisés en priorité lors de ce pilote.

Il est prévu pour l'étude nationale qu'**une partie des prélèvements soit conservée dans une biobanque**, afin de disposer de matériel biologique pour répondre aux problèmes de santé publique émergents. Un double consentement spécifique sera demandé à cet effet, en différenciant le consentement de la collection biologique et de la possibilité d'études génétiques ultérieures (annexe 3).

Des volumes de 38 ml de sang du cordon et 200 ml d'urines de la mère ont été souhaités (estimation haute) pour réaliser l'ensemble des analyses, ainsi qu'une mèche de cheveux (60 cheveux ou 2-3 mm d'épaisseur) et 5 à 10 ml de lait maternel à la maternité. Le personnel soignant a effectué ces prélèvements selon une procédure précise (annexe 4), sous la coordination d'une sage-femme "référente", recrutée pour l'étude Elfe. Les prélèvements ont été gardés au frais (+4 °C) et récupérés deux fois par jour par un transporteur désigné par l'Etablissement français du sang (EFS) pour être centrifugés et aliquotés dans des cryotubes. La congélation à moins 80 °C ou moins 196 °C a eu lieu dans les deux centres EFS du pilote (Tours et Annemasse) dans les 48 heures et le stockage a été prévu pour une durée de trois ans pouvant être prolongée.

Pour la réalisation des prélèvements, la sage-femme enquêtrice (agissant sous l'autorité du chef de service) a expliqué aux parents les objectifs de l'étude et l'intérêt de leur participation pour la recherche scientifique. Elle leur a remis une information écrite (annexe 5) et a recueilli le consentement éclairé de la mère (annexe 3). La mère en a conservé un exemplaire et a remis le second à la sage-femme. Une question a été posée à la mère sur son acceptation ou non d'un éventuel prélèvement de sang veineux (pour analyse des marqueurs nutritionnels et environnementaux) afin de tester l'acceptation d'un tel prélèvement.

- **Le lait maternel à domicile**

Des volumes de 160 ml de lait maternel mature ont été obtenus pour un sous-échantillon de femmes allaitantes (n=126). Les femmes concernées ont été informées par une note explicative de l'intérêt de ce prélèvement (annexe 1).

Un flacon spécial ainsi que le mode d'emploi leur ont été remis à cet effet (annexe 2). Elles retournaient ce flacon par courrier sous une enveloppe étanche pré-affranchie à la biobanque de l'EFS. Un rappel téléphonique des mères a été réalisé les 14 et 15 novembre.

3.3 Mise en œuvre de l'étude

3.3.1 Aspects réglementaires

Un dossier a été soumis dans un premier temps au Comité de protection des personnes (CPP) de Créteil, au Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé (CCTIRS) du ministère délégué à la Recherche, puis à la Commission nationale de l'informatique et des libertés (Cnil). Par ailleurs, un dossier de déclaration de la collection biologique de l'étude a été déposé auprès du ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche.

3.3.2 Partenaires participant à la collecte des prélèvements

Les services de maternité ont été sollicités pour participer activement à la collecte. Les sages-femmes de bloc ont travaillé en relation avec un professionnel référent pour l'étude dans la maternité, ont été rémunérées par Elfe et désignées par leur chef de service. Des sages-femmes des centres de protection maternelle infantile (PMI) ont été aussi recrutées pour la collecte en suite de couches. Leur rôle pour la partie prélèvement a consisté à s'assurer de la réception du matériel de l'étude (étiquettes d'identification, matériels de prélèvement), afficher les consignes au bloc, vérifier la présence de réfrigérateur dans la maternité et sa disponibilité, préparer les échantillons et remplir la fiche de suivi et de transmission des échantillons.

L'EFS, a participé à la collecte, à l'acheminement, au traitement, à l'aliquotage et au stockage des prélèvements biologiques par leurs différents sites. Une convention de partenariat entre l'EFS et l'InVS (agissant pour le GIS Elfe pour les aspects de collecte biologique concernant le pilote) a été mise en place courant juillet 2007. Différentes réunions organisées par l'EFS ont permis entre autres une simplification et une standardisation de notre schéma d'aliquotage trop complexe (annexes 7 et 7 bis).

3.3.3 Mise en place de la collecte en maternité

Le matériel

Pour satisfaire les demandes spécifiques des chercheurs selon leur discipline, trois différents types de tubes ont été nécessaires pour le sang de cordon : tube sec avec activateur de coagulation (n=2), tubes secs éléments traces (n=1), tube K_2 EDTA éléments traces (n=2). Ces tubes ont été disposés dans les cartons en kits individuels avec les flacons pour les urines et le lait. Le nombre de kits a été estimé à partir du nombre de naissances attendues (estimation pour 2004) ; ils ont été envoyés à la personne référente de chaque maternité.

La formation

Des consignes ont été affichées dans chaque salle d'accouchement (annexe 4) à l'intention des sages-femmes de bloc. Une réunion d'information et d'échanges a été organisée dans chaque département avant le lancement de l'étude, ainsi qu'une réunion de bilan après son déroulement. Une permanence téléphonique a été mise en place par l'équipe de coordination de l'étude avec un suivi actif des maternités au quotidien pendant la phase de terrain.

L'identification des prélèvements

La gestion des prélèvements biologiques a nécessité un système d'étiquettes d'identification avec codes barres, étanches et résistantes à la congélation. Ces étiquettes ont été collées sur les tubes des prélèvements de la mère et de l'enfant et les cryotubes de conservation afin d'assurer leur traçabilité. Les planches d'étiquettes imprimées par l'EFS ont été glissées dans le cahier Elfe d'enregistrement des naissances. Elles ont aussi été collées sur les questionnaires et l'ensemble des documents d'une même accouchée permettant ainsi de relier ultérieurement les données des questionnaires aux données de la collecte biologique. Ces manipulations ont été réalisées par la sage-femme de bloc ou la sage-femme enquêtrice. L'ensemble des données a été stocké sur un serveur à l'Ined et un fichier informatique anonymisé a été élaboré contenant l'ensemble des données de collecte des prélèvements.

Le transfert des prélèvements

Les tubes de prélèvements conservés à +4 °C dans le réfrigérateur du service de la maternité ont été acheminés deux fois par jour par un transporteur désigné par l'EFS vers l'EFS de Tours (prélèvement de la Seine-Saint-Denis) et les sites d'Annemasse et de Valence (prélèvements de la région Rhône-Alpes) pour centrifugation, aliquotage et stockage. Le schéma d'aliquotage a été réalisé en tenant compte de la multiplicité des demandes des chercheurs et en standardisant les volumes des aliquots au maximum.

Les prélèvements ont été stockés en biobanque à l'EFS pour trois ans (jusque fin 2010). Une part des prélèvements a, depuis lors, été acheminée vers les laboratoires d'analyse compétents et les résultats transmis aux chercheurs.

3.4 Dosages biologiques et rendu des résultats

Les dosages des prélèvements ont été réalisés afin, d'une part de s'assurer de la qualité de la biothèque constituée et d'autre part, d'estimer les seuils de détection pour certains dosages ou de valider des choix méthodologiques (faisabilité et qualité des analyses concernant les seuils de détection pour les polluants émergents, la validation de la collecte et de la conservation…).

La recherche du Cytomégalovirus (CMV) par PCR dans le sang du cordon a été réalisée par les laboratoires du Centre national de référence (CNR) du CMV du CHU de Limoges et de l'hôpital Necker à Paris afin de dépister les nouveau-nés présentant une infection congénitale à CMV. Il s'agit d'un test de PCR en temps réel quantitatif dont le seuil sur du sang total est à 1 000 copies/mL.

La sérologie toxoplasmique (recherche d'immunoglobulines par agglutination directe haute sensibilité au sang du cordon) a été réalisée par le laboratoire du CNR de la toxoplasmose situé au CHU de Reims. Les immunoglobulines G maternelles sont transmises dans le sang du cordon et leur titrage permet de définir le statut immunitaire de la mère en fin de grossesse.

Aucun rendu individualisé des résultats n'a été envisagé pour cette phase de l'étude, exception faite des résultats biologiques de sang de cordon concernant le CMV ou la plombémie élevée qui auraient pu modifier la prise en charge de l'enfant. Dans le cas d'un résultat anormal (plomb, CMV), les parents ont été informés par un médecin désigné par l'équipe projet et par courrier. Par ailleurs, des résultats agrégés ont été diffusés auprès des participants sous la forme d'une lettre d'information.

D'autres dosages ont été envisagés pour le pilote dans un but méthodologique : estimation du seuil de quantification des laboratoires pour les substances émergentes et hiérarchisation des biomarqueurs prioritaires dans l'étude nationale, en fonction des résultats des pilotes. Ainsi, les polluants émergents : bisphénol A, phtalates, organoétains, pesticides (atrazine, glyphosate, carbamates, pyréthrinoides) ont été dosés courant 2010 dans les urines ; et les retardateurs de flamme bromés, les perfluorés, les PCBs et les dioxines dans le lait maternel mature ainsi que la cotinine urinaire. Par ailleurs, la confrontation des questionnaires et des dosages biologiques a apporté également des éléments méthodologiques. Ainsi, le titrage des anticorps anti-toxoplasmiques a été effectué dans le sang de cordon par le CNR de la toxoplasmose afin de les comparer avec les données sérologiques de la mère documentées sur le dossier médical.

Des dosages nutritionnels comme les antioxydants, la vitamine D ou les marqueurs d'inflammation ont été prévus pour évaluer l'influence du mode de recueil et de stockage des prélèvements biologiques. Toujours dans le sang de cordon, les analyses du profil en acides gras des phospholipides membranaires ont été envisagées dans les globules rouges pour valider la procédure de collecte ; les molécules métabolomiques pour la mise en évidence des biomarqueurs précoces des maladies pertinentes à prendre en compte pour la suite. Dans le lait maternel, les analyses envisagées ont été celles du profil d'acides gras et du CD14, notamment pour valider les méthodes de conservation (cryotubes versus paillettes). La plupart de ces dosages ont été réalisés au cours de l'année 2010.

4. Résultats

4.1 Taux de participation et de réalisation de la collecte biologique dans Elfe

Sur 571 naissances, 301 familles ont accepté de participer à l'étude Elfe. Parmi les femmes ayant accepté le suivi par Elfe, 296 ont donné également leur consentement pour les prélèvements (pour 5 femmes, il n'y a pas eu de feuille de consentement dans les documents envoyés par les enquêtrices). Les seuls refus spécifiquement dus aux prélèvements ont été liés à des raisons culturelles ou religieuses (notamment pour les cheveux et témoins de Jéhovah pour le sang). On a noté un très bon taux d'acceptation (98 % pour le recueil biologique et 91% pour la collection biologique) puis de réalisation effective des prélèvements parmi les mères Elfe (78,5 % pour le sang et 74,3 % pour les urines) (tableau 1). Toutefois, le taux de retour du lait maternel "domicile" 6 à 8 semaines après l'accouchement et après une relance téléphonique est resté faible (18,7 % pour la région Rhône-Alpes et 4,6 % pour la Seine-Saint-Denis parmi les femmes ayant accepté Elfe). Par ailleurs, une évaluation du taux d'acceptation auprès des mères pour un éventuel prélèvement veineux a été faite lors de ce pilote. Les résultats montrent que 69% des mères accepteraient un prélèvement veineux pour Elfe.

L'acceptation du suivi Elfe a consisté essentiellement à donner son accord pour la réalisation des étapes ultérieures : à savoir, un entretien en face à face à 2 mois, un autre par téléphone à 1 et 2 ans puis un entretien en face à face aux 3 ans de l'enfant, et enfin, par téléphone chaque année.

I TABLEAU 1 I

Taux de réalisation des prélèvements sur l'ensemble des naissances

	Tous		Seine-Saint-Denis		Rhône-Alpes	
	n	%	n	%	n	%
Naissances	571	-	184	-	387	-
Sang cordon	448	78,5	144	78,3	304	78,6
Urines	424	74,3	132	71,7	292	75,5
Cheveux[a]	288	50,4	80	43,5	208	53,7
Lait maternel "maternité"[b]	126	22,1	31	16,8	95	24,5

[a, b] *Les prélèvements de cheveux et de lait maternité ont été réalisés après le recueil de l'accord de participation à Elfe par un consentement écrit et signé de la mère.*

L'analyse de ces taux de réalisation des prélèvements par maternité (tableau 2) a montré un taux de réalisation qui a varié de 50 à 100 % pour le sang de cordon et de 36 à 100 % pour les urines.

| TABLEAU 2 |

Taux de réalisation des prélèvements par maternité pour l'ensemble des naissances

MATERNITE	Région	Statut	Niveau	Naissances N=571	Prélèvements réalisés		Taux de réalisation	
					Sang N=449	urines N=420	Sang	Urines
CH BOURGOIN JALLIEU	Rhône-Alpes	Public	1	17	13	13	76,5 %	76,5 %
CH AIX-LES-BAINS	Rhône-Alpes	Public	1	4	4	4	100,0 %	100,0 %
CH BOURG-SAINT-MAURICE	Rhône-Alpes	Public	1	4	2	3	50,0 %	75,0 %
CH MONTBRISON	Rhône-Alpes	Public	1	7	5	5	71,4 %	71,4 %
CH PRIVE DE LA LOIRE	Rhône-Alpes	Privé	1	27	21	18	77,8 %	66,7 %
CH SAINT-CHAMOND	Rhône-Alpes	Public	1	13	13	12	100,0 %	92,3 %
CH VALS D'ARDECHE	Rhône-Alpes	Public	1	3	2	2	66,7 %	66,7 %
CLINIQUE MUTUALISTE DES EAUX-CLAIRES	Rhône-Alpes	Public	1	21	17	19	81,0 %	90,5 %
CLINIQUE PASTEUR	Rhône-Alpes	Privé	1	21	15	14	71,4 %	66,7 %
CLINIQUE SAINT-CHARLES-ROUSSILLON	Rhône-Alpes	Privé	1	12	7	8	58,3 %	66,7 %
CLINIQUE SAINT-VINCENT-DE-PAUL	Rhône-Alpes	Privé	1	21	18	12	85,7 %	57,1 %
CLINIQUE VERT GALANT	Seine-Saint-Denis	Privé	1	11	10	9	90,9 %	81,8 %
HOPITAL PRIVE DE SEINE-SAINT-DENIS	Seine-Saint-Denis	Privé	1	28	18	14	64,3 %	50,0 %
MATERNITE LES LILAS	Seine-Saint-Denis	Public	1	14	7	7	50,0 %	50,0 %
POLYCLINIQUE VAUBAN	Seine-Saint-Denis	Privé	1	22	18	15	81,8 %	68,2 %
CH ALBERTVILLE	Rhône-Alpes	Public	2	12	10	12	83,3 %	100,0 %
CH DE VIENNE LUCIEN HUSSEL	Rhône-Alpes	Public	2	20	14	17	70,0 %	85,0 %
CH FIRMINY	Rhône-Alpes	Public	2	24	22	21	91,7 %	87,5 %
CH ROANNE	Rhône-Alpes	Public	2	27	26	25	96,3 %	92,6 %
CH VOIRON	Rhône-Alpes	Public	2	19	14	13	73,7 %	68,4 %
CLINIQUE BELLEDONNE	Rhône-Alpes	Privé	2	28	25	27	89,3 %	96,4 %
HOPITAL EUROPEEN DE PARIS ROSERAIE	Seine-Saint-Denis	Privé	2	16	15	13	93,8 %	81,3 %
HOPITAL JEAN VERDIER	Seine-Saint-Denis	Public	2	25	15	14	60,0 %	56,0 %
HOPITAL ROBERT BALLANGER	Seine-Saint-Denis	Public	2	24	22	19	91,7 %	79,2 %
CH CHAMBERY	Rhône-Alpes	Public	3	33	21	19	63,6 %	57,6 %
CHU GRENOBLE	Rhône-Alpes	Public	3	30	17	11	56,7 %	36,7 %
CHU SAINT ETIENNE HOPITAL NORD	Rhône-Alpes	Public	3	41	37	35	90,2 %	85,4 %
CENTRE HOSPITALIER DE SAINT-DENIS	Seine-Saint-Denis	Public	3	44	41	39	93,2 %	88,6 %

Les tableaux 3 et 4 rapportent les taux d'acceptation et de réalisation des prélèvements uniquement des mères ayant accepté le suivi Elfe (et non l'ensemble des naissances). Ainsi, le taux d'acceptation a été excellent (tableau 3) : plus de 98 % des femmes ayant accepté Elfe acceptaient également le recueil biologique. Seules 5 femmes ayant accepté le suivi Elfe n'ont eu aucun prélèvement de sang de cordon. En revanche, 30 femmes ont refusé le suivi dans Elfe mais ont néanmoins accepté le recueil (n=30), la collection biologique – c'est-à-dire la mise en biobanque pour des études ultérieures – (n=21) et 6 ont refusé explicitement les études génétiques.

Tableau 3

Taux d'acceptation des prélèvements pour les mères Elfe

	Tous		Seine-Saint-Denis		Rhône-Alpes	
	n	%	n	%	n	%
Naissances	571		184		387	
Elfe	301	53,0	87	47,3	214	55,7
Recueil biologique	296	98,3	85	97,7	211	98,6
Collection biologique	276	91,7	82	94,3	194	90,7
Etudes génétiques	246	81,7	78	89,7	168	78,5

Le taux de réalisation a été différent du taux d'acceptation : environ 15 % des prélèvements n'ont pu être réalisés malgré l'acceptation de la mère (problèmes liés à la charge de travail au bloc, aux conditions de l'accouchement, aux éventuels oublis…).

Tableau 4

Taux de réalisation des prélèvements pour les mères Elfe

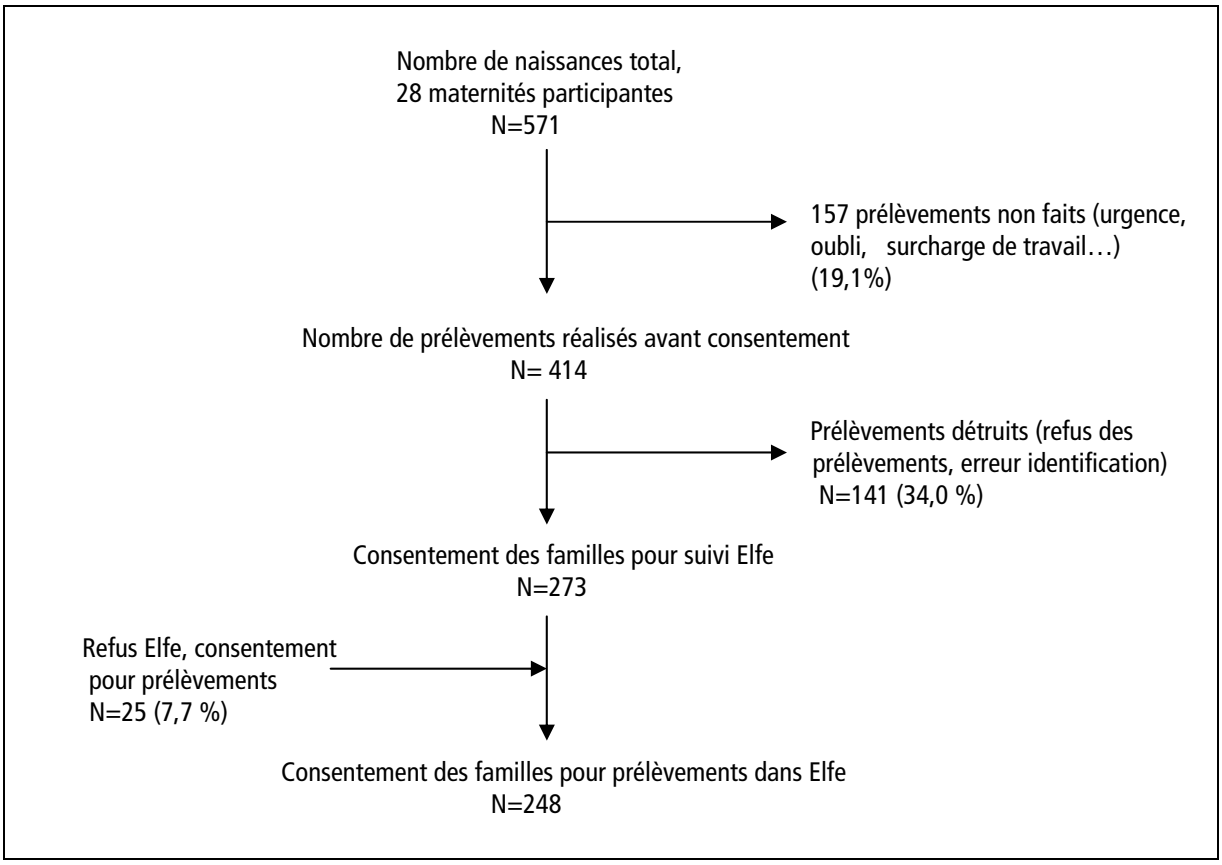
	Tous		Seine-Saint-Denis		Rhône-Alpes	
	n	%	n	%	n	%
Elfe	301		87		214	
Sang cordon	248	82,4	69	79,3	179	83,6
Urines	252	83,7	71	81,6	181	84,6
Cheveux	269	89,4	76	87,4	193	90,2
Lait maternel "maternité"[a]	126	41,9	35	40,2	91	42,5
Lait maternel "domicile"[b]	46	15,3	6	6.9	40	18,7

[a] *Le taux d'allaitement maternel à la maternité (exclusif et mixte) est de 68 % dans Elfe.*

[b] *Le taux d'allaitement maternel (exclusif et mixte) recueilli lors de l'étude à 2 mois est de 48,5 %. Le taux d'allaitement exclusif au sein est de 32,9 %.*

I SCHÉMA 1 I

Schéma de la collecte biologique du sang de cordon en maternité dans Elfe pilote


Nombre de naissances total,
28 maternités participantes
N=571
157 prélèvements non faits (urgence, oubli, surcharge de travail…) (19,1%)
Nombre de prélèvements réalisés avant consentement
N= 414
Prélèvements détruits (refus des prélèvements, erreur identification)
N=141 (34,0 %)
Consentement des familles pour suivi Elfe
N=273
Refus Elfe, consentement pour prélèvements
N=25 (7,7 %)
Consentement des familles pour prélèvements dans Elfe
N=248

4.2 Volumes recueillis par type de prélèvement

4.2.1 Sang de cordon

En prenant comme hypothèse un taux d'hématocrite placentaire de 50 % environ, un volume moyen de 20 ml environ de sang placentaire pourra être prélevé.

I TABLEAU 5 I

Volume de sang placentaire prélevé et sa déclinaison en matrices sanguines *

	N	Min.	25ème centile	50ème centile	75ème centile	Max.	Moyenne	Ecart-Type
Volume sang placentaire prélevé (ml)	449	4,5	17	21	26	35,5	21	6,3
Sérum (ml)	448	1	3,5	5	6,5	9	5,1	1,8
Sérum élément trace (ml)	357	1	1,5	2	2,5	3	2	0,6
Plasma (ml)	389	1	2	2,5	3	3,5	2,5	0,5
Sang total (ml)	430	1	2,5	3,5	4,5	5,5	3,3	1,1

*Calcul fait sur l'ensemble des prélèvements disponibles.

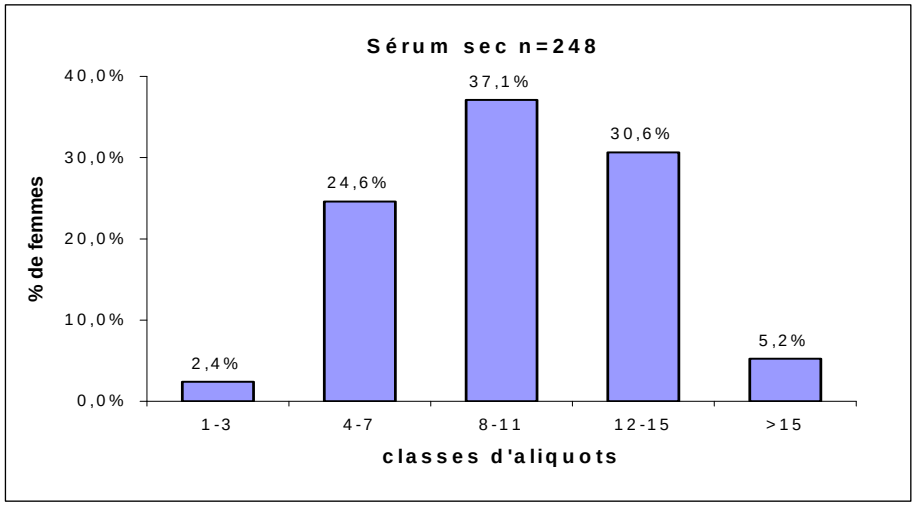
Les graphiques suivants illustrent le nombre d'aliquots disponibles pour le sérum, le sérum éléments traces, le sang total et le plasma. Ils ne concernent que les femmes qui ont eu un prélèvement de sang de cordon, donné leur consentement et accepté le suivi dans Elfe (**n=301**).

4.2.1.1 Sérum

En moyenne, 9,8 aliquots de 0,5 ml de sérum ont été recueillis par sujet à partir des prélèvements sur tubes secs (figure 1), avec un maximum de 18 aliquots. Le nombre prévisionnel du schéma d'aliquotage était de 10 (18 en prenant en compte la biothèque). Ces 10 aliquots de 0,5 ml prévus par sujet ont été disponibles pour la moitié des femmes.

| FIGURE 1 |

Distribution par classe d'aliquots du sérum

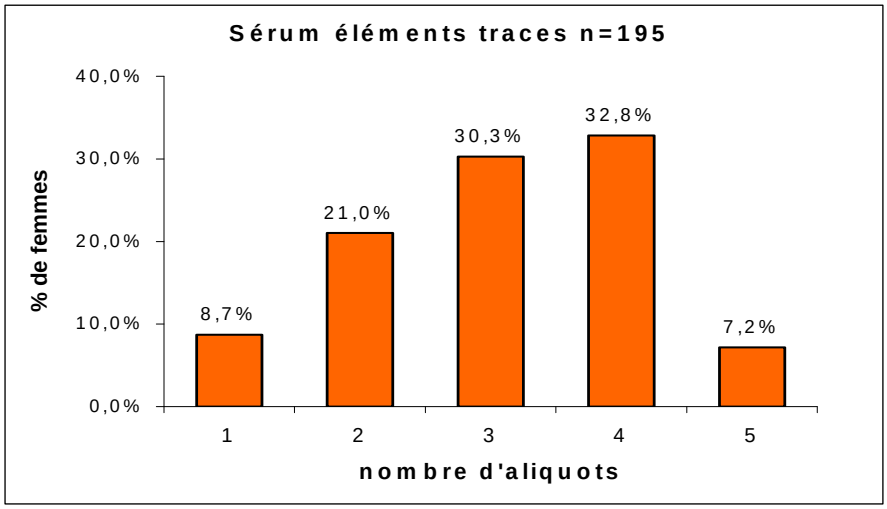


4.2.1.2 Sérum éléments traces

En moyenne, 3 aliquots de 0,5 ml de sérum ont été recueillis à partir du tube sec "éléments traces" (figure 2), avec un maximum de 5 aliquots. Le nombre prévisionnel du schéma d'aliquotage était de 5 (6 en prenant en compte la biothèque). Ces 5 aliquots de 0,5 ml prévus par sujet ont été disponibles pour 7,2 % seulement des femmes.

| FIGURE 2 |

Distribution par nombre d'aliquots de sérum éléments traces

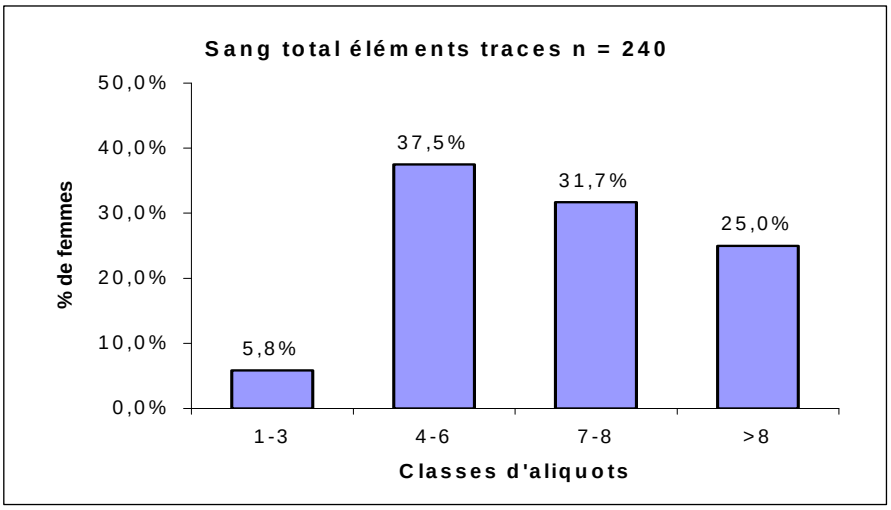


4.2.1.3 Sang total éléments traces

En moyenne, 6,6 aliquots de 0,5 ml de sang total ont été recueillis à partir du tube sec "éléments traces" (figure 3), avec un maximum de 10 aliquots. Le nombre prévisionnel du schéma d'aliquotage était de 4 (9 en prenant en compte la biothèque). Ces 4 aliquots de 0,5 ml prévus par sujet ont été disponibles pour 94 % des femmes.

I FIGURE 3 I

Distribution du sang total selon les classes d'aliquots

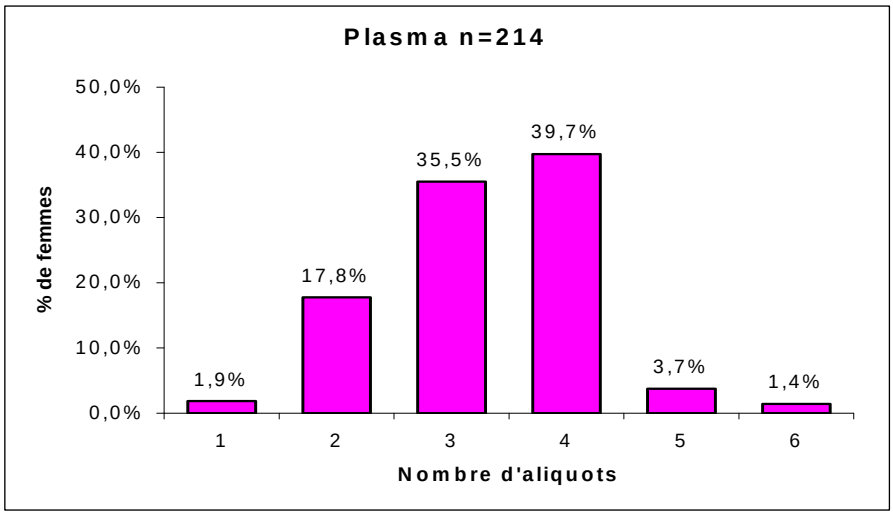


4.2.1.4 Plasma

En moyenne, 3,3 aliquots de 0,5 ml de plasma ont été recueillis à partir du tube EDTA (figure 4), avec un maximum de 6 aliquots. Le nombre prévisionnel du schéma d'aliquotage était de 4 (6 en prenant en compte la biothèque). Ces 4 aliquots de 0,5 ml prévus par sujet ont été disponibles pour 45 % des femmes.

I FIGURE 4 I

Distribution par nombre d'aliquots du plasma



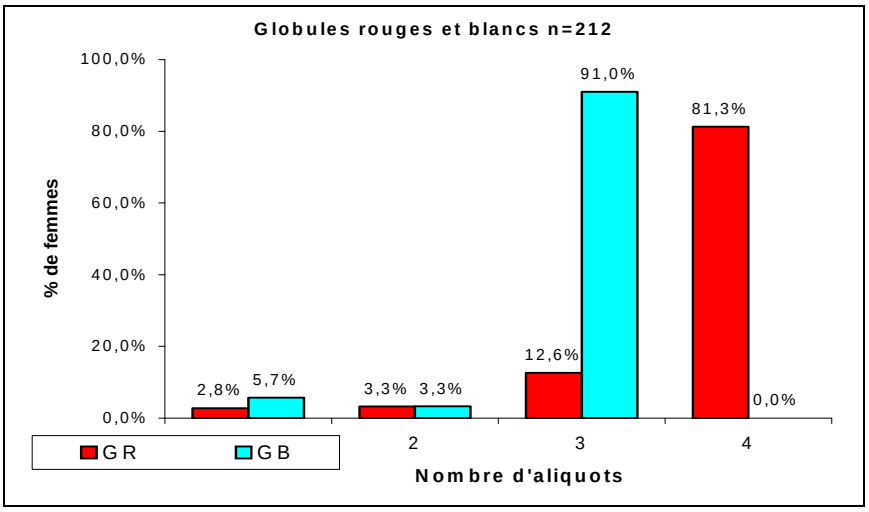
4.2.1.5 Éléments figurés du sang

Nombre moyen par type de globules : GR : 3,7 aliquots GB : 2,9 aliquots.

Il a été initialement prévu de diluer les globules rouges dans un tampon tris et les globules blancs dans une solution de RNALater qui permettraient de préserver l'intégrité de l'acide ribonucléique pour les dosages futurs. Des contraintes techniques et logistiques n'ont pas permis l'utilisation de ces deux solutions (délai pour la commande, lourdeur administrative, dilution…). Les globules rouges et blancs récupérés ont été répartis respectivement en 4 et 3 aliquots (figure 5).

| FIGURE 5 |

Distribution des aliquots de globules rouges et globules blancs

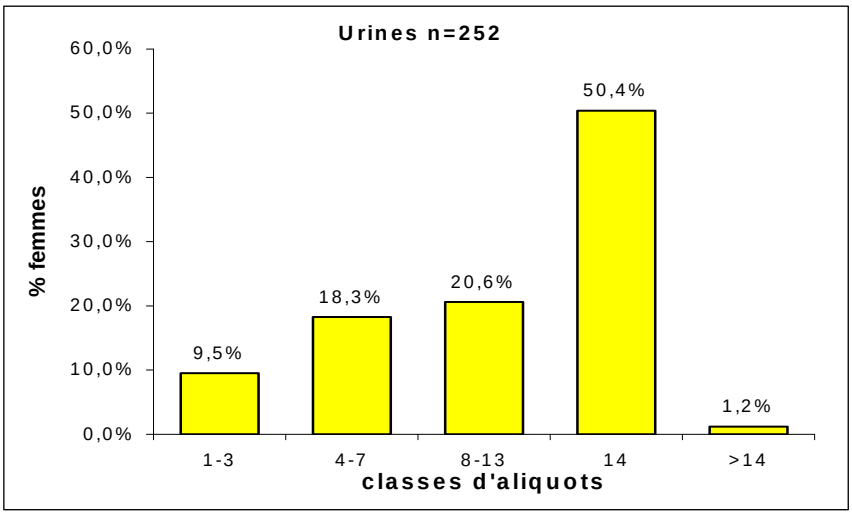


4.2.2 Urines

Il a été possible de recueillir la totalité des 140 ml demandés pour 127 femmes (soit 50,4 % des femmes). En moyenne, 10,7 aliquots de 10 ml d'urines ont été recueillis par sujet (figure 6). Le nombre prévisionnel selon le schéma d'aliquotage était de 10 (14 avec la biothèque). Ces 10 aliquots prévus par sujet ont été disponibles pour 66 % des femmes.

| FIGURE 6 |

Distribution par classe d'aliquots d'urines des urines



4.2.3 Les cheveux

Ce prélèvement a été recueilli pour 89 % des mères qui ont accepté Elfe. Certaines femmes n'ont pas accepté le prélèvement de cheveux pour des raisons religieuses (ou de superstition).

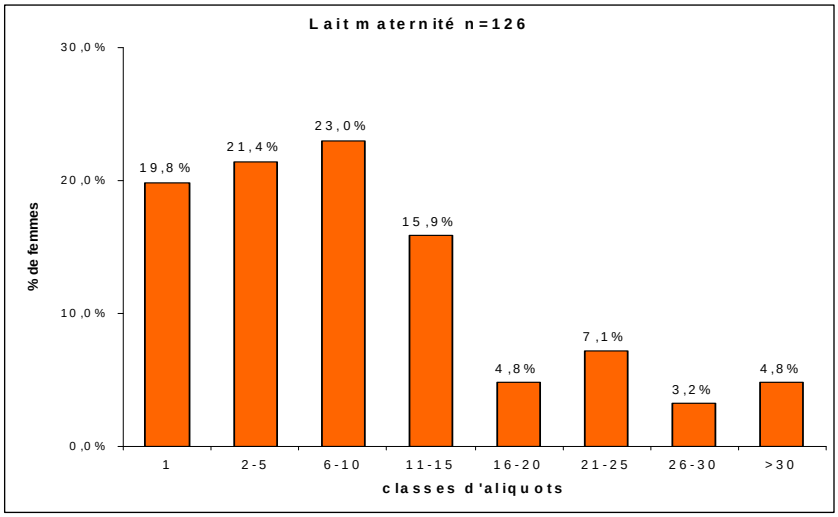
4.2.4 Le lait maternel "maternité"

L'allaitement maternel (exclusif ou mixte) a été choisi par 68 % des mères avec une disparité selon les départements enquêtés (45,5 % à 80 %).

En moyenne, 9,7 aliquots de 0,5 ml (environ 5 ml) de lait par femme ont été recueillis en maternité (figure 7). Le nombre prévisionnel selon le schéma d'aliquotage était de 10 (12 en prenant en compte la biothèque). Ces 10 aliquots prévus par sujet ont été disponibles pour 38,1 % des femmes, malgré les contraintes liés à ce recueil. Un seul aliquot de 0,5 ml a été disponible pour 19,8 % des femmes. Cet effectif correspondait vraisemblablement aux femmes qui ont manifesté leur accord pour ce recueil mais qui n'ont pas pu le réaliser (temps de séjour insuffisant pour la montée laiteuse).

I FIGURE 7 I

Distribution en nombre d'aliquots du lait "maternité"



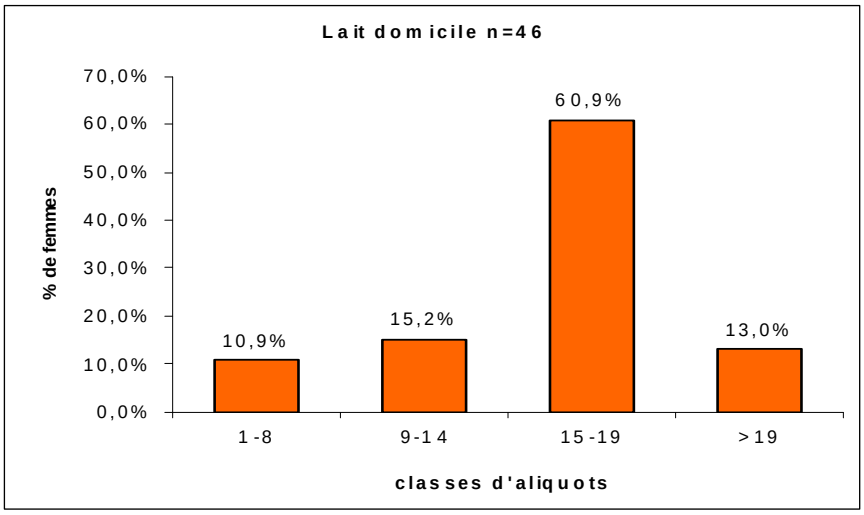
4.2.5 Le lait maternel "domicile"

En moyenne, 15 aliquots de 10 ml (150 ml) de lait ont été recueillis par femme (figure 8), avec un maximum de 20 aliquots (200 ml). Le nombre prévisionnel du schéma d'aliquotage était de 12 (120 ml). 82,6 % des femmes qui ont atteint ce nombre (16 en prenant en compte la biothèque, soit 63 % des femmes ayant pu fournir un volume de 160 ml de lait). Parmi les femmes qui ont allaité leur bébé en maternité, 61,5 % ont prélevé leur lait en maternité et 22,5 % l'ont également recueilli à domicile. Selon les informations recueillies lors des relances téléphoniques, certaines mères ont arrêté d'allaiter au moment du recueil à domicile (un mois et demi après l'accouchement) ou n'ont pas pensé avoir suffisamment de lait. Pour 12 maternités (4 en Seine-Saint-Denis et 8 en Rhône-Alpes), aucun retour de lait "domicile" n'a été observé ce qui laisse supposer qu'il y a probablement eu oubli de ce recueil par les sages-femmes. En effet, certaines enquêtrices trop surchargées ont fait le choix de ne pas conduire cette partie de l'étude.

Toutes les mères ayant reçu le kit de prélèvement de lait à domicile lors de leur sortie en maternité ont reçu systématiquement un rappel téléphonique un mois après leur sortie de la maternité. Ces rappels téléphoniques ont eu pour objectif de les motiver, de leur ré-expliquer la procédure de recueil, les conditions d'envoi par voie postale et de répondre à leurs éventuelles interrogations. Seulement 25 mères ont envoyé leur lait spontanément avant le rappel téléphonique. Certaines ont attendu ce contact téléphonique pour effectuer le recueil. Ces relances téléphoniques ont permis d'augmenter d'environ 40 % le taux de retour.

FIGURE 8

Distribution du lait "domicile" par classe d'aliquots



La totalité des échantillons conservés en biobanque est présentée dans le tableau 5. En moyenne, par femme, pour le sang de cordon, environ 13 aliquots de 0,5 ml de sérum ont été disponibles ainsi que 7 aliquots de 0,5 ml de sang total ; 3 aliquots de 0,5 ml de plasma ; 4 aliquots de 0,5 ml de globules rouges et 3 aliquots de 0,5 ml de globules blancs. Pour les urines, 11 aliquots de 10 ml ont été disponibles en biothèque. Pour le lait maternel, 10 aliquots de 0,5 ml ont été conservés en biothèque pour le lait en maternité et 15 aliquots de 10 ml pour le lait au domicile (tableau 6).

TABLEAU 6

Récapitulatif du nombre d'aliquots par type d'échantillons pour les mères Elfe

	N	Min.	25e centile	50e centile	75e centile	Max.	Moyenne	Écart-Type
Sérum	248	1	7	9	13	18	9,8	3,6
Sérum éléments traces	195	1	2	3	4	5	3,1	1,1
Sang total éléments traces	240	1	5	7	8,5	10	6,6	2,1
Plasma	214	1	3	3	4	6	3,3	0,9
Globules rouges	214	1	4	4	4	4	3,7	0,7
Globules blancs	212	1	3	3	3	3	2,9	0,5
Hémoglobine (g/L)	220	2,2	12,35	14,8	16,1	19,7	14,1	3,1
Urines	252	1	7	14	14	20	10,7	4,2
Lait "maternité"	126	1	3	7	14	35	9,7	8,9
Lait "domicile"	46	3	14	16	18	20	15,1	4,5

4.3 TRANSPORT ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Pour étudier les différentes étapes de transport des prélèvements biologiques, une fiche de traçabilité entre les maternités et les sites EFS a été mise en place (annexes 6 et 6bis). Cette fiche a renseigné les dates et heures de prélèvements en maternité, les dates et heures de transport et de réception à l'EFS ainsi que les dates et heures de traitement et de mise en biothèque des aliquots. Ces fiches n'ont pas été renseignées complètement, notamment pour

la partie à remplir en maternité par la sage-femme référente. Les données manquantes ont été récupérées, pour certaines, à partir du cahier d'accouchement Elfe pour les dates et heures de naissance. Initialement cela a concerné 32 données manquantes à Annemasse et quatre données manquantes à Tours. Après nettoyage et complétude des données, il n'a subsisté que huit données manquantes à Annemasse.

L'analyse des temps de transports est résumée dans le tableau 7. La moitié des échantillons biologiques de sang ont été réceptionnés par l'EFS d'Annemasse dans les 13 premières heures suivant leur prélèvement. Un temps relativement court a séparé la réception et l'aliquotage pour la moitié des échantillons de sang (1,5 heures). Pour le site de Tours, le délai entre le prélèvement et la réception à l'EFS était de 18 heures pour la moitié des échantillons. Le délai entre leur réception et l'aliquotage a été plus long qu'à Annemasse (5,3 heures).

Pour le site d'Annemasse, 10 % des échantillons de sang ont été réceptionnés 24 heures après leur prélèvement et 20,5 % ont été aliquotés plus de 24 heures après ce qui démontre les éventuels oublis des prélèvements dans les réfrigérateurs de la maternité lors du passage du transporteur (cas des grosses maternités) ou les prélèvements sont dans plusieurs réfrigérateurs.

Pour le site de Tours, 20 % des prélèvements de sang ont été réceptionnés par l'EFS plus de 24 heures après leur collecte, et l'aliquotage a eu lieu plus de 24 heures après pour 63 % d'entre eux (tableau 7 : informations traitées sur l'ensemble des prélèvements de sang réalisés). Ces données sont relatives au circuit de collecte et de traitement du sang de cordon uniquement. Trois extrêmes n'ont pas été prises en compte des les analyses suivantes en raison du délai important entre le prélèvement et la mise en biothèque (entre 91 et 100,5 h). Ces prélèvements étaient en provenance des maternités privées du Rhône-Alpes (deux d'entres elles ont été formées par téléphone). Ces prélèvements ont tous été recueillis le denier jour d'inclusion au bloc (4 octobre 2007). Leur arrivée tardive à l'EFS (plus de 48 heures) a donc nécessité leur destruction par l'EFS en accord avec l'équipe projet.

TABLEAU 7

Tableau récapitulatif des différentes étapes de la collecte biologique (sang)

	N	Moyenne	Écart-type	Min.	P25	P50	P75	Max.
Annemasse								
Temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS : H1	309	14,9	11,3	2	8,2	12,8	19	97,3
Temps entre le prélèvement et l'aliquotage : H2	307	19,6	10,2	3,6	14,2	19,3	23,2	98,7
Temps entre la réception et l'aliquotage : H3	306	5,0	5,6	0,3	1,5	1,5	12	36,6
Temps entre le prélèvement et la mise en biothèque : H4	307	24,7	10.3	7,6	18,9	24,8	28,6	100,4
Tours								
Temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS : H1	141	17,7	8,7	3,6	9,8	17,8	23,2	47,3
Temps entre le prélèvement et l'aliquotage : H2	141	26,2	8,1	5,6	22,2	25,8	28,3	51,7
Temps entre la réception et l'aliquotage : H3	141	8,9	6,6	1,1	3,7	5,3	15,8	21,2
Temps entre le prélèvement et la mise en biothèque : H4	141	29,8	8,2	7,5	25,8	29,3	33,5	55,0
EFS (Tours et Annemasse)								
Temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS : H1	450	15,8	10,7	2	8,7	13,8	20,9	97,3
Temps entre le prélèvement et l'aliquotage : H2	448	21,7	10,1	3,6	15,9	21,2	25,8	98,7
Temps entre la réception et l'aliquotage : H3	447	6,2	6,2	0,3	1,5	3	12,3	36,6
Temps entre le prélèvement et la mise en biothèque : H4	448	26,3	9,9	7,5	20,3	26,3	30,2	100,4

I TABLEAU 7 (SUITE) I

Tableau récapitulatif des différentes étapes de la collecte biologique (sang)

	N	Moyenne	Écart-type	Min.	P25	P50	P75	Max.
Annemasse								
Temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS : H1	305	13,9	7,2	2	8,1	12,8	18,7	44,2
Temps entre le prélèvement et l'aliquotage : H2	304	18,9	7,2	3,6	14	19,2	23,1	46,2
Temps entre la réception et l'aliquotage : H3	303	5,1	5,7	0,3	1,5	1,5	12	36,6
Temps entre le prélèvement et la mise en biothèque : H4	304	24	7,6	7,6	18,8	24,8	28,5	53
Tours								
Temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS : H1	141	17,7	8,7	3,6	9,8	17,8	23,2	47,3
Temps entre le prélèvement et l'aliquotage : H2	141	26,2	8,1	5,6	22,2	25,8	28,3	51,7
Temps entre la réception et l'aliquotage : H3	141	8,9	6,6	1,1	3,7	5,3	15,8	21,2
Temps entre le prélèvement et la mise en biothèque : H4	141	29,8	8,2	7,5	25,8	29,3	33,5	55
EFS (Tours et Annemasse)								
Temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS : H1	446	15,1	7,9	2,0	8,6	13,7	20,8	47,3
Temps entre le prélèvement et l'aliquotage : H2	445	21,2	8,2	3,6	15,8	21,1	25,8	51,7
Temps entre la réception et l'aliquotage : H3	444	6,3	6,2	0,3	1,5	3,0	12,3	36,6
Temps entre le prélèvement et la mise en biothèque : H4	445	25,9	8,2	7,5	20,3	26,3	30,2	55,0

4.4 ANALYSE DE LA QUALITÉ DES PRÉLÈVEMENTS

Dès réception à l'EFS, 20 % des échantillons ont coagulés et 40 % ont été hémolysés. Ce résultat était attendu car le sang de cordon coagule très vite (hématocrite fœtale élevée de l'ordre de 50 %) et que les conditions de prélèvements n'ont pas pu être optimales, dans le souci de ne pas surcharger le personnel en salle de naissance et dans l'optique de faisabilité à l'échelle nationale. Une analyse des facteurs conditionnant la qualité des prélèvements a été menée pour explorer les différentes pistes d'amélioration en vue d'une généralisation de l'étude : choix du matériel, technique de prélèvement, effet maternité (fonction du nombre d'accouchements, de la motivation des équipes ?).

Dans un premier temps, **l'influence sur l'indicateur de coagulation** (présence de caillots : oui/non) a été étudiée sur les variables suivantes :

- région de prélèvement et de traitement des échantillons (Seine-Saint-Denis, EFS de Tours ; Rhône-Alpes, EFS d'Annemasse) ;
- utilisation d'une seringue pour le prélèvement (oui/non) ;
- indicateur de remplissage des tubes (tubes remplis oui/non/inconnu (Rhône-Alpes)) ;
- niveau de la maternité ayant réalisé le prélèvement (1, 2, 3) ;
- statut de la maternité (public, privé) ;
- nombre de naissances dans la maternité le jour du prélèvement (variable liée au niveau de la maternité) ;
- différents temps de la chaîne depuis le prélèvement jusqu'au stockage :
  - H1 : temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS (heures),
  - H2 : temps entre le prélèvement et l'aliquotage (heures) (H2=H1+H3),

- H3 : temps entre la réception à l'EFS et l'aliquotage (heures),
- H4 : temps entre la mise en biothèque et le prélèvement (heures).

Il a été observé une grande variabilité entre les maternités avec des taux de coagulation allant de 0 % à 100 % selon les maternités, ceci pouvant traduite à la fois un effet de la personne ayant réalisé le prélèvement mais également des difficultés organisationnelles ou autre. Il n'a pas été possible d'étudier le lien entre le taux de coagulation et la personne ayant réalisé le prélèvement, l'information n'étant pas disponible. Pour l'effet maternité, on a disposé des variables telles que le statut (privé/public) ou le niveau de la maternité.

On a observé des taux de coagulation plus élevés dans les maternités privées (27,8 % *vs* 16,5 % dans les maternités publiques).

TABLEAU 8

Description des échantillons coagulés selon les caractéristiques des maternités

	Non coagulé		Coagulé	
	Effectif	**%**	**Effectif**	**%**
Niveau de la maternité				
1	126	75,9	40	24,1
2	137	83,5	27	16,5
3	94	80,3	23	19,7
Statut				
Privé	104	72,2	40	27,8
Public	253	83,5	50	16,5

On a observé un taux de coagulation sensiblement plus important en Seine-Saint-Denis qu'en Rhône-Alpes (28 % *vs* 16 %) mais ceci a été probablement surtout dû à l'utilisation des seringues en Seine-Saint-Denis, puisque l'on a observé un taux de coagulation largement plus important pour les prélèvements réalisés à l'aide d'une seringue que ceux réalisés par écoulement direct (42 % *vs* 16 %). Cette hypothèse a été confortée par l'observation de taux de coagulation proche dans les deux régions pour les prélèvements réalisés par écoulement direct. En effet, 16 % des échantillons prélevés par écoulement direct ont coagulés en Seine-Saint-Denis *vs* 15 % de ceux prélevés par écoulement direct en Rhône-Alpes. Pour le remplissage des tubes, la coagulation a été plus importante pour les tubes qui n'ont pas été complètement remplis (34 % de coagulation pour les tubes non complètement remplis *vs* 24 % pour les tubes complètement remplis).

Cependant, compte tenu des incertitudes sur la construction *a posteriori* de cette variable, ce facteur n'a pas pu être étudié dans les analyses. Les résultats descriptifs nous ont cependant enseigné que les consignes devront prendre en compte le remplissage optimal des tubes.

TABLEAU 9

Description des échantillons coagulés en fonction des caractéristiques des prélèvements

	Non coagulé		Coagulé	
	Effectif	%	Effectif	%
Région				
RA - Annemasse	256	83,7	50	16,3
SSD - Tours	101	71,6	40	28,4
Utilisation d'une seringue pour le prélèvement				
Non	315	84,0	60	16
Oui	42	58,3	30	41,7
Tube complètement rempli[a]				
Oui	62	75 ,6	20	24,4
Non	39	66,1	20	33,9
Inconnu	256	83,7	50	16,3

[a] *Cette variable est laissée ici à titre indicatif mais n'a pas été prise en compte dans les analyses.*

On a observé une grande variabilité dans les délais entre le prélèvement et l'aliquotage : le temps total entre le prélèvement et la mise en biothèque étant en moyenne de 26 heures et comprise entre 7,5 heures et 55 heures.

Les temps de transports ont été plus longs pour les échantillons coagulés (médiane de 13,3 heures et 20,9 heures pour H1 et H2 respectivement pour les échantillons non coagulés *vs* 16,6 heures et 22,7 heures respectivement pour H1 et H2 pour les échantillons coagulés (tableau 10)).

TABLEAU 10

Description des échantillons coagulés en fonction des différents temps de transport

Coagulation	Variable	Nbre	Manquants	Moyenne	Écart-type	Min.	p25	p50	p75	Max.
Non	**H1**	356	1	14,7	8	2	8,3	13,3	20,3	47,3
	H2	355	2	20,9	8,4	3,6	15	20,9	25,5	51,7
	H3	354	3	6,3	6,2	0,5	1,5	3,1	12,3	36,6
	H4	355	2	25,8	8,4	7,6	20,3	26,2	30,3	55
Oui	**H1**	90	0	16,4	7,1	4	9,8	16,6	22,3	34,3
	H2	90	0	22,3	7,4	5,6	18,3	22,7	26,4	42,3
	H3	90	0	6,2	6,2	0,3	1,5	2,9	12,5	19
	H4	90	0	26	7,7	7,5	21,4	26,8	29,5	45

Les facteurs de risque ont été analysés dans un modèle de régression afin d'analyser leur effet conjoint sur la coagulation. Le modèle utilisé était un modèle log-poisson. Ce modèle était utilisé comme une alternative à la régression logistique, dans la mesure où les proportions d'échantillons coagulés étant très différentes entre les diverses classes des variables, l'odds-ratio issus d'une régression logistique n'aurait pu être une bonne approximation du risque relatif. Les résultats du modèle log-poisson ont été directement exprimés sous la forme d'un risque relatif.

La variable d'intérêt était la coagulation (0/1) et les variables identifiées ont été :
- utilisation d'une seringue ou écoulement direct ;
- région de prélèvement et de traitement ;
- statut de la maternité, niveau de la maternité ou nombre de naissances. Ces variables étant fortement liées, une seule variable parmi ces trois a finalement été incluse dans le modèle ;

- temps de transport : le délai entre le prélèvement et la réception à l'EFS (H1) a été le temps de transport le plus critique et a donc été pris en compte.

Pour le temps de transport, la forme de la relation a été testée par l'introduction d'un terme non linéaire dans le modèle (sur la forme d'un "spline cubique"). Les résultats ont montré que la relation avec le temps de transport était linéaire sur l'intervalle 0-20 heures. La forme de la relation n'a pas été interprétable au-delà en raison d'un intervalle de confiance très large (peu de sujets, répartis sur une plage de 20 à 47 heures). Le terme linéaire a été introduit et interprété uniquement sur l'intervalle 0-20 heures. Le modèle final a contenu les variables suivantes :

- le temps de transport H1 (linéaire sur l'intervalle 0-20 heures) ;
- le statut de la maternité (privé/public) ;
- une variable intégrant la région de prélèvement et le mode de prélèvement en trois catégories :
  - prélèvement par écoulement direct en Seine-Saint-Denis,
  - prélèvement par seringue en Seine-Saint-Denis,
  - prélèvement par écoulement direct en Rhône-Alpes.

TABLEAU 11

Résultats du modèle incluant les différents facteurs identifiés comme pouvant influencer la coagulation

	Coefficient	Ecart-type	z	Pr (>|z|)	RR	IC 95 %
Constante	-1,960	0,312	-6,291	<0,001		
Temps H1 (sur 0-20 heures)	0,032	0,017	1,856	0,063	1,03	[1;1,07]
Seine-Saint-Denis : écoulement direct	Réf					
Seine-Saint-Denis : seringue	1,026	0,328	3,129	0,002	2,79	[1,47;5,31]
Rhône-Alpes : écoulement direct	0,236	0,333	0,708	0,479	1,27	[0,66;2,43]
Statut : public	Réf					
Statut : privé	0,392	0,186	2,102	0,036	1,48	[1,03;2,13]

On a observé une augmentation du risque de coagulation lorsque :

- le temps de transport a augmenté (risque relatif (RR) de 1,03 [1;1,07] pour une augmentation d'une heure, p=0,06) ;
- l'on a utilisé une seringue *vs* écoulement direct en Seine-Saint-Denis (RR 2,79 [1,47;5,31], p<0,01) ;
- lorsque le prélèvement a été réalisé dans une maternité privée plutôt que publique (RR 1,48 [1,03;2,13], p=0,04).

On n'a pas noté de différence entre les prélèvements réalisés par écoulement direct en Seine-Saint-Denis et en Rhône-Alpes (RR 1,27 [0,66;2,43], p=0,48).

Outre l'analyse des facteurs ayant influencé sur la coagulation, les conditions préanalytiques ont été évaluées par le dosage des CD40L dans le sérum. En effet, il a été démontré que cette protéine a une forte sensibilité aux fluctuations de températures et peut être ainsi un bon indicateur de qualité des prélèvements biologiques conservés en biobanque. Ainsi, sa teneur décroît à mesure que la température augmente : une concentration des CD40L à 4,3 ng/ml indique une exposition des échantillons de sérum pendant au moins 48 h à 20 °C (p<0,16); celle inférieure à 2,2 ng/ml, une exposition au moins 12 h à 37 °C (p<0,05) et celle inférieure à 0,7 ng/ml une exposition au moins 24 h à 37 °C (p<0,05) (13). Nos résultats ont montré que nous avions seulement 6 échantillons de sérum (sur un total de 271 sérums analysés) avec des concentrations des CD40L à 3,8-4,9 ng/ml, indiquant une possible exposition à 20 °C pendant 48h. Effectivement, parmi ces 6 échantillons, 4 ont eu un temps H1 (temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS) supérieur à 15h et les 2 autres ont eu un temps H2 (temps entre le prélèvement et l'aliquotage) supérieur à 21h.

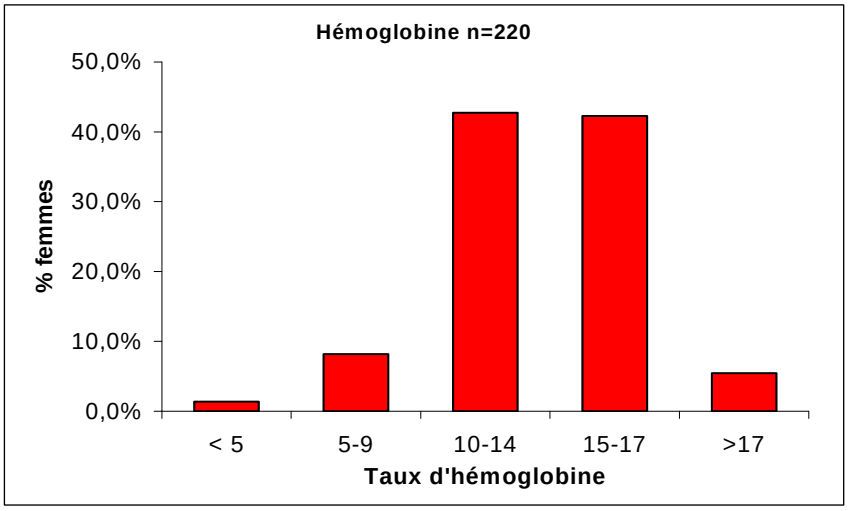
4.5 Dosages biologiques : plomb, cytomégalovirus et toxoplasmose

4.5.1 L'hémoglobine

L'hémoglobine fœtale a été dosée dans les 24 heures par l'EFS sur du sang total issu de tube K_2 EDTA. Il est apparu à travers ces dosages que l'hématocrite fœtal a été supérieur à 50 % comme prévu dans le schéma d'aliquotage. Des problèmes de coagulation rapide du sang ou d'hémolyse ont rendu les résultats de cette analyse difficiles à exploiter. Certains taux d'hémoglobine ont été très bas ou au contraire trop élevés (figure 9). Il faut souligner que certains tubes ayant coagulé ont bouché les automates. Ainsi, l'EFS d'Annemasse nous a signalé 14,8 % des dosages d'hémoglobine non réalisés pour cause de sang coagulé.

I FIGURE 9 I

Distribution du taux d'hémoglobine



4.5.2 Le plomb

Le plomb a été finalement dosé dans 236 aliquots au laboratoire de l'Institut de santé au travail du Nord de la France de Lille, mais certains tubes ont présenté des caillots à leur arrivée au laboratoire (tableau 12).

I TABLEAU 12 I

Etat qualitatif des tubes pour le dosage du plomb

Biothèque	État bon	Caillots	Total
Annemasse	157	3	160
Tours	62	14	76
Total	219	17	236

Les principaux problèmes rencontrés lors de l'analyse ont été l'état de ces tubes (coagulation) et le volume disponible (<0,5 ml) et sont résumés dans le tableau 8. Ainsi, dans cinq tubes, la quantité de sang a été insuffisante pour faire le prélèvement de 250 µl (tubes sans caillots) ; ces cinq tubes provenaient d'Annemasse. Le faible volume disponible a nécessité l'adaptation des techniques au volume par spectromètre de masse couplé à plasma inductif et n'a pas permis de réaliser des contrôles en cas de plombémie élevée. Pour six tubes, la présence de caillots n'a pas permis de faire la mesure. Parmi les 225 résultats donnés par le laboratoire, 11 l'ont été avec des réserves du fait de la présence de caillots dans le tube, susceptibles d'influencer la valeur mesurée (tableau 13).

TABLEAU 13

Problèmes rencontrés lors du dosage de la plombémie

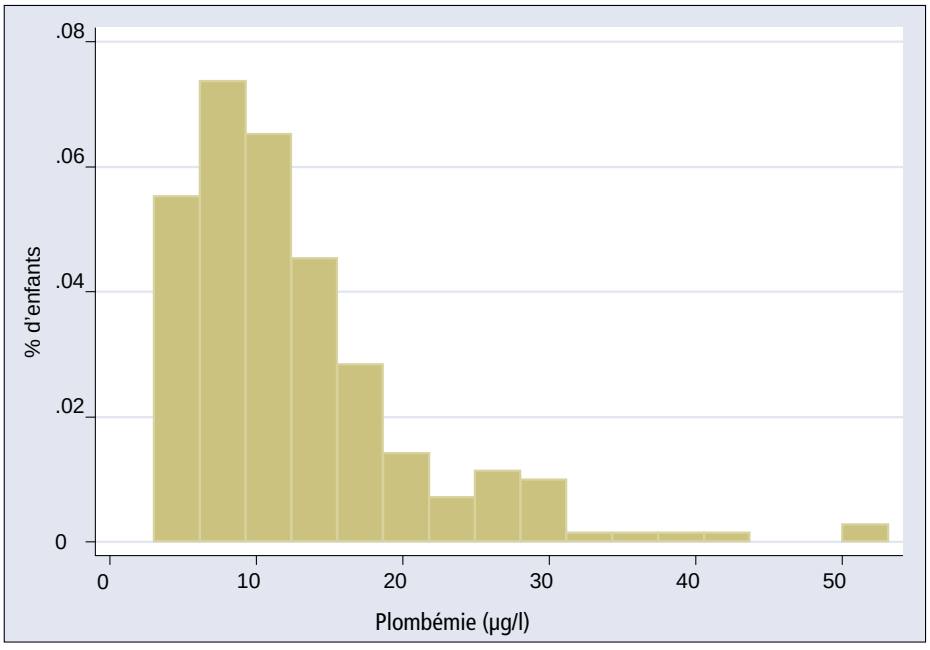
Etat du tube	Quantité insuffisante	Non déterminé	Plombémie mesurée	Total
Bon	5	0	214	219
Caillots	0	6	11	17
Total	5	6	225	236

Tous les résultats ont été supérieurs à la limite de quantification donnée par le laboratoire (2 µg/l). La moyenne géométrique (n=225) a été estimée à 11,0 µg/l (IC 95 % : 10,3-11,9) et la valeur maximum à 50 µg/l (figure 10). Aucune plombémie élevée ni aucun cas de saturnisme n'ont été observés après les dosages, ce qui est cohérent compte tenu des effectifs.

Un protocole de rendu des résultats avait été établi en fonction de la plombémie. Il était prévu une information de la mère par téléphone par un toxicologue du centre antipoison et de toxicovigilance en cas de plombémie ≥80 µg/l ainsi qu'une lettre à destination du médecin traitant. Par ailleurs, une note d'information sur les effets du plomb et les sources d'exposition au plomb était prévue et envoyée aux enquêtés avec leur résultat de plomb, ceci quel que soit le résultat.

FIGURE 10

Distribution de la plombémie dans le sang de cordon

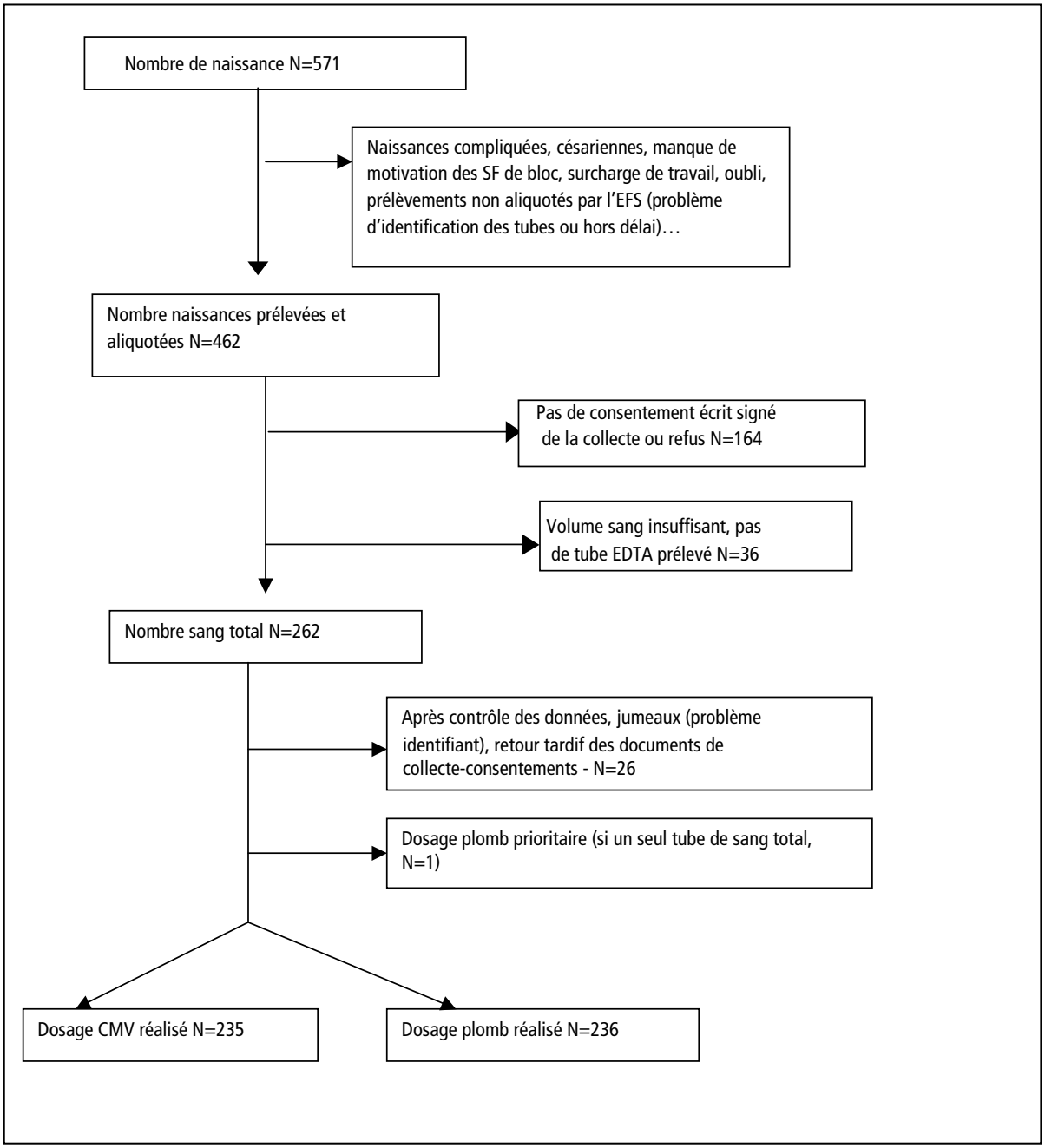


La moyenne géométrique des plombémies (11,0 µg/l) est du même ordre que celles observées dans deux études récentes. La première concernait 1021 nouveau-nés de décembre 2003 à mai 2004 dans les maternités de l'hôpital de Beaujon à Clichy (92), de l'hôpital de Louis-Mourier à Colombes (92) et de l'hôpital de Nanterre (92). La moyenne géométrique des plombémies était de 16,6 µg/l [23]. La seconde étude a inclus 1370 nouveau-nés dans cinq maternités publiques de Seine-Saint-Denis (93), entre décembre 2005 et juillet 2006. La moyenne géométrique a été estimée à 13,3 µg/l [24].

La figure 11 résume les problèmes rencontrés pour les dosages immédiats (plomb, CMV). Ainsi, parmi 571 naissances, 462 ont pu faire l'objet d'un recueil biologique, 262 ont accepté de participé à Elfe et ont donné leur consentement et parmi celles-ci environ 235 ont pu avoir un dosage de plomb ou de CMV.

| FIGURE 11 |

Schéma récapitulatif des inclusions et causes d'exclusion des mères pour le dosage du CMV et du plomb


Nombre de naissance N=571
Naissances compliquées, césariennes, manque de motivation des SF de bloc, surcharge de travail, oubli, prélèvements non aliquotés par l'EFS (problème d'identification des tubes ou hors délai)…
Nombre naissances prélevées et aliquotées N=462
Pas de consentement écrit signé de la collecte ou refus N=164
Volume sang insuffisant, pas de tube EDTA prélevé N=36
Nombre sang total N=262
Après contrôle des données, jumeaux (problème identifiant), retour tardif des documents de collecte-consentements - N=26
Dosage plomb prioritaire (si un seul tube de sang total, N=1)
Dosage CMV réalisé N=235
Dosage plomb réalisé N=236

4.5.3 Le cytomégalovirus CMV

Les recherches du CMV par PCR ont été ont été réalisées pour toutes les mères ayant accepté ou non le suivi Elfe et pour lesquelles nous disposons d'un consentement écrit et signé (n=236). La recherche de CMV a été réalisée sur 159 aliquots provenant de l'EFS d'Annemasse au laboratoire du CNR CMV de Limoges et 77 aliquots provenant de l'EFS de Tours au laboratoire du CNR CMV de l'hôpital Necker à Paris. Ces deux laboratoires ont présenté l'avantage d'utiliser les mêmes méthodes pour le dosage du CMV. À Necker, sur les 77 dosages, 9 ont présenté des caillots, soit 11,7 % des prélèvements. La présence de caillots n'a pas gêné l'extraction de l'ADN pour la recherche du CMV. Aucun cas d'infection congénitale à CMV n'a été détecté sur l'ensemble des dosages des deux laboratoires. L'échantillon de 236

prélèvements était insuffisant pour le dépistage d'une infection dont la prévalence est voisine de 0,25 % (soit 0,59 enfants positifs attendus) et il s'agit avant tout d'une étude de faisabilité.

4.5.4 La toxoplasmose

Selon les données du dossier médical de la mère consulté à la maternité, 142 femmes étaient séronégatives (absence d'anticorps anti-toxoplasmiques, 56 étaient séropositives (48 avaient des IgG, 4 des IgM, et 4 avaient une immunité connue avant leur grossesse). Aucune information relative à l'immunité toxoplasmique n'a été retrouvée pour 5 mères. Une comparaison entre les données sérologiques présentées dans le dossier et le titrage des IgG dans le sang du cordon par le CNR de la toxoplasmose du CHU de Reims a été réalisée pour 194 femmes. Les résultats sont concordants entre les deux sources dans 94% des cas. La proportion de femmes considérée comme séropositives à partir du dossier (26,8 %) est un peu plus faible que d'après les résultats du CNR (29,4 %). Du fait de l'hémoconcentration du sang du cordon et de la différence des techniques utilisées (celles utilisées pour le dosage des IgG des mères qui figurent dans les dossiers médicaux de la maternité, et celle plus sensible utilisée dans le sang du cordon par le CNR), il est normal qu'il y ait un peu plus de résultats positifs dans le sang du cordon.

5. Difficultés rencontrées

5.1 Dossiers d'autorisation

Aucune difficulté particulière n'a été rencontrée, si ce n'est une charge de travail importante pour les membres de l'équipe Elfe au niveau scientifique (rédaction protocole), administratif et logistique, les mêmes personnes étant par ailleurs sollicitées dans le même laps de temps sur les aspects opérationnels de mise en œuvre de l'étude (commandes de matériel, mise en place partenariat…). Les dossiers ont reçu des avis favorables le 27 juin 2007 pour le CCTIRS, 10 juillet 2007 pour le CPP (passage en commission le 2 juillet 2007) et pour la Cnil (avis N° 907031).

5.2 Mise en place du partenariat

Le partenariat avec l'EFS a été amorcé par une réunion courant juin, ce qui a laissé très peu de temps pour organiser les étapes du pilote avec l'EFS, d'autant que ces étapes (mise en place des étiquettes, commandes de tubes, schéma d'aliquotage, faisabilité technique de l'étude...) de mise en œuvre ont eu lieu en période estivale, ce qui n'est pas propice. La dernière réunion de mise en œuvre du pilote avec l'EFS a entraîné quelques modifications dans le matériel utilisé (un tube supplémentaire, utilisation de diagnobag®) et donc dans les consignes ce qui a engendré un retard dans l'envoi de matériel en maternité. Pour répondre à la contrainte de calendrier, les deux sites de l'EFS ont dû travailler dans des conditions inhabituelles, ce qui a entraîné une surcharge financière et logistique importante (prestataire extérieur pour le transport des prélèvements des maternités vers les sites notamment).

5.3 Recrutement des maternités et des enquêteurs en maternité

Sur les 38 maternités identifiées, 10 n'ont pas participé (trois en Ardèche, cinq en Seine-Saint-Denis, une en Isère et une en Savoie). Les raisons ont été :

- pour trois maternités, le refus du chef de service ;
- dans 1 cas, la démission imprévue de la professionnelle pressentie (précédant de très peu l'étude) ;
- dans 4 cas, une charge de travail trop lourde pour les équipes (procédures d'accréditation ou de restructuration en cours dans les maternités, ou réalisation dans les derniers jours ou à la formation de la charge de travail liée à l'étude) ;
- dans 2 cas, le personnel de la maternité n'était pas intéressé.

Il n'a pas été possible de trouver des solutions pour toutes les maternités qui n'ont pas opposé un refus de principe : les professionnels de PMI sont intervenus mais en nombre insuffisant et les sages-femmes libérales, comme lors du

premier pilote, n'ont pas répondu à nos sollicitations. Une seule professionnelle retraitée est intervenue, contrairement au premier pilote, où de nombreux recrutements ont pu s'organiser avec les conseils départementaux de l'ordre des sages-femmes. On peut souligner la difficulté particulière en Seine-Saint-Denis qui est le département français qui présente le ratio nombre de sages-femmes/naissances le plus faible de France métropolitaine, toutes catégories de sages-femmes confondues. En ce qui concerne l'Ardèche, les temps de transports des professionnels hors maternité pour aller réaliser l'étude dans les maternités et assurer une part suffisante de leur travail habituel, ont été un obstacle au recrutement pour Elfe. Les désistements ont eu lieu au cours du temps, jusqu'au jour de l'étude, ce qui a compliqué les relations entre les partenaires (transporteurs, EFS…) et a entraîné des envois inutiles de matériel.

5.4 Envoi du matériel aux maternités

Les commandes de matériel se sont déroulées en juillet et août. Du personnel avait été recruté pour la mise en carton, prévue fin août pour un envoi début septembre, mais la période estivale n'a pas été propice à la réception du matériel dans les temps. L'arrivée du personnel recruté pour le pilote et la consultation des partenariats ayant été tardive (début septembre), cela a eu des conséquences sur les documents à produire (feuille de traçabilité des prélèvements, production des étiquettes d'identification…) et a retardé la mise en cartons. Le retard accumulé dans cette préparation des cartons a eu un retentissement non négligeable sur l'ensemble du dispositif en aval (notamment sur les services de l'Ined pour l'affranchissement des envois). Il faut par ailleurs souligner que la mise en kits individuels de naissance a nécessité une charge de travail considérable, et la multiplicité des manipulations dues aux modifications des documents a occasionné des difficultés. Le roulement du personnel pendant l'été, la nécessité de composer avec les temps partiels de l'équipe projet et la disparité des informations parmi les membres de l'équipe projet (calcul du nombre de naissances, relation avec les maternités, état des commandes, matériel nécessaire) n'a pas permis la supervision des opérations par un interlocuteur unique et disponible en continu durant cette phase. Les maternités ont donc reçu tardivement leur matériel d'étude (une semaine avant le début de l'étude voire moins), ce qui a laissé peu de temps pour vérifier ou compléter les documents reçus.

Par ailleurs, le nombre de naissances a été sous-estimé (difficulté de fournir des estimations par jour étant donné les fluctuations journalières du nombre de naissances) et 10 maternités ont manqué de matériel dès le second jour d'étude. Le suivi actif téléphonique dans ces maternités a permis de résoudre le problème dans quelques cas.

5.5 Formation des sages-femmes

Les formations des sages-femmes ont eu lieu le 10 septembre en Seine-Saint-Denis, le 17 septembre en Ardèche et les 24 et 25 septembre en Savoie, Loire et Isère. Ces formations n'ont pas été homogènes entre elles au niveau des consignes (exemple : utilisation du sac diagnobag®, acceptation de la phase maternité uniquement sans suivi…). Le temps de préparation de ces réunions de formation n'a pas été suffisant. La formation du 25 septembre, liée au couplage avec la réunion du réseau périnatal à Grenoble, a été tardive pour un début d'étude au 1er octobre. Il n'a pas été prévu que les sages-femmes de bloc soient directement formées par l'équipe de coordination Elfe. Les sages-femmes enquêtrices formées n'ont pas eu le temps nécessaire pour transmettre les consignes et informations à toutes les équipes de sages-femmes de bloc. Ces formations ont été complétées par des entretiens téléphoniques et des échanges de mails pour certaines maternités qui en ont manifesté le besoin.

5.6 Recueil des prélèvements

5.6.1 Le sang

La principale raison du non-recueil en salle de naissance était liée à la charge de travail en salle de naissance quand il y avait beaucoup d'accouchement dans un même laps de temps. Le temps pour les prélèvements en salle de naissance était estimé par certaines maternités à 10-15 mn. À ces raisons se sont ajoutées les césariennes en urgence, l'état de santé de l'enfant, ou les éventuels oublis qui n'ont pas permis le prélèvement de sang. Il n'a été possible de recueillir en moyenne que deux à trois tubes sur les cinq demandés, soit environ 20 ml (ou alors les cinq tubes étaient remplis au 1/10e). Plusieurs techniques ont été testées : l'usage d'une seringue pour aspirer davantage de volume, l'usage de

vacutainer® ou le versement direct du sang dans les tubes. Il s'est avéré que l'usage de la seringue de 50 ml a engendré un phénomène de coagulation important. Pour pallier à cet inconvénient, les sages-femmes ont parfois utilisé deux seringues de 10 ml ou ont retiré le piston. Le sang du cordon a coagulé très vite en général, parfois même dans l'aiguille, même avec l'usage du vacutainer®. Faire couler le sang directement dans les tubes a semblé meilleur du point de vue de la coagulation, mais a posé un problème d'étanchéité des tubes dans quelques maternités. Par ailleurs, cette technique est moins sûre par rapport à la manipulation des produits sanguins. Environ 20 % des prélèvements ont coagulés et certains prélèvements ont été hémolysés. La qualité des prélèvements a été variable selon les maternités dans la mesure où le prélèvement de sang de cordon n'a pas été une pratique courante pour toutes les sages-femmes de bloc, ce qui n'a pas toujours permis d'optimiser le volume de sang recueilli. La qualité des aliquots a été en revanche très satisfaisante (volume et qualité) dans certaines maternités.

Globalement, la qualité s'est améliorée au cours du temps, suite à un suivi téléphonique actif par l'équipe Elfe et à une meilleure maîtrise du geste technique (moins de coagulation à partir de J2-J3). Le matériel de prélèvement a également pu concourir au problème de coagulation (présence d'un activateur de coagulation dans le tube sec). L'EFS a suggéré de prévoir un gel séparateur pour le tube sec pour garantir la tenue des tubes pour la suite et assurer une meilleure séparation entre le culot et le sérum. Cette proposition a toutefois posé problème au "groupe expositions chimiques" qui s'interrogeait sur la composition du gel séparateur et ses interactions éventuelles avec les composés à mesurer. De plus, la présence de gel séparateur ou d'activateur de coagulation dans les tubes secs ne semblent pas souhaitable pour les analyses protéomiques car elle peut perturber ces analyses [15].

5.6.2 Les urines

Pour certaines femmes, il a été difficile d'obtenir le volume nécessaire même par sondage lors d'un seul recueil. Les principales difficultés rencontrées sur ce type de prélèvement ont été la moindre compliance de la vessie chez la femme enceinte et l'oubli de ce type de prélèvement par les sages-femmes de bloc par rapport au prélèvement de sang de cordon. Les urines n'ont pas toujours pu être prélevées au même moment que le sang, et n'ont pas toujours été bien mises dans un sac zip (étanchéité), ni bien étiquetées au niveau des fiches de transmission. Par ailleurs, le pot contenait une capsule blanche dans le couvercle (double sécurité) qu'il a fallu penser à ôter. Des problèmes ont été soulevés quant à la feuille de transmission, ce prélèvement figurait sur la feuille de transmission du sang (la feuille de transmission des urines a été ainsi souvent absente quand l'urine a été recueillie après le prélèvement de sang de cordon, d'où des difficultés pour identifier les étiquettes par la suite). De ce fait, les dates de prélèvement d'urines n'ont pas correspondu à celle de la tournée de transport, et sont souvent restées seules au réfrigérateur. Enfin, pour optimiser les volumes, certaines maternités ont effectué ce prélèvement en deux temps ce qui augmente les risques d'oubli dans le réfrigérateur et complique également le circuit logistique des prélèvements.

5.6.3 Les cheveux

Le seul problème identifié a concerné l'insuffisance d'identification sur l'enveloppe (celle-ci était sur le papier bristol placé à l'intérieur de l'enveloppe), d'où la nécessité pour l'EFS de reporter l'identification sur les enveloppes.

5.6.4 Le lait en maternité

Les difficultés liées à la mise en route de l'allaitement et le départ précoce de l'accouchée n'ont pas permis le recueil du lait maternel pour certaines femmes. Le prélèvement de lait a été plus difficile dans les grosses maternités à cause de la surcharge de travail, et sans doute plus compliqué pour certaines mères en raison du départ précoce de la maternité. Le recueil de lait en maternité a été trop contraignant (recueil à la même heure pour toutes les femmes (entre 8 et 10 heures) et une tétée entière), ce qui n'a pas toujours pu être respecté. D'un point de vue technique, le diamètre des tubes doit être mieux adapté (moins étroit).

5.6.5 Le lait à domicile

Les principales raisons du non-recueil du lait à domicile ont été les suivantes :
- arrêt de l'allaitement ;
- passage à l'allaitement mixte ;
- volume de lait insuffisant ;

- absence de tire lait ;
- refus.

Les difficultés rencontrées par l'EFS ont été essentiellement :
- la réception de flacons vides (prélèvements non réalisés, un flacon mal fermé s'est vidé lors du transport) ;
- l'impossibilité d'aliquoter trois prélèvements pour des raisons techniques (rupture de stock des tubes d'aliquotage) ;
- un oubli d'identification du flacon par la mère.

5.7 Transport des prélèvements

Les horaires d'une sage-femme référente n'ont pas été compatibles avec la tournée du matin des transporteurs. Pour un arrivage en début d'après midi, les prélèvements ont dû partir à 7 heures le matin de la maternité pour être traités par l'EFS. Certains prélèvements ne sont pas partis avec la bonne navette et ont été traités le lendemain (dépassement des délais de 24h). Des problèmes au niveau du transport dans certaines maternités de la Seine-Saint-Denis ont été signalés :
- un seul passage a été effectué par jour au lieu des deux prévus ;
- le laps de temps entre les deux passages a été trop court (à 11h et 15h, exemple de la maternité la Roseraie).

Dans les grosses maternités, faute de place, les prélèvements ont été stockés dans des réfrigérateurs différents, parfois à des étages différents du service, ce qui n'a pas facilité le travail de rassemblement, de vérification et de remise au transporteur.

5.8 Traitement des prélèvements

Le volume des prélèvements recueillis n'a pas permis de respecter l'ambitieux schéma d'aliquotage (environ 50 % des tubes prévus ont été remplis). Tous les milieux (sang total, plasma, sérum) ont cependant été stockés pour permettre les différents types de dosages à tester pour ce pilote. Les solutions tripture ou RNA Later n'ont pas pu être utilisées (logistique trop lourde et délai trop court pour passer les commandes). Les dosages permettront de savoir si l'utilisation d'eau distillée ou du sérum physiologique est suffisante pour la suite. Enfin, la mise en cryotubes a nécessité un travail technique beaucoup plus important que la mise en paillettes (cette dernière est automatisée à l'EFS et engendre donc moins de risque d'erreur).

5.9 Traitement informatique des données

Le fichier informatique des données des deux centres EFS à l'équipe Elfe n'a pas été standardisé. Un travail d'harmonisation préalable a été nécessaire avant le contrôle des données. Enfin, il faut parfois noter un envoi tardif des maternités pour quelques documents, voire des documents incomplets (feuilles de consentement notamment), ce qui a retardé le processus global (destruction des échantillons, analyses immédiates).

5.10 Destruction des prélèvements

Dans le cadre de cette étude, la passation du consentement écrit/éclairé auprès de la mère n'a pas été possible à son arrivée à la maternité. Les recueils de sang de cordon et d'urines ayant été réalisés avant le consentement, l'équipe Elfe s'est engagée à la destruction de tous les prélèvements pour lesquels les mères auraient apporté un refus *a posteriori*. Cette destruction a concerné 167 femmes (33 % des mères prélevées). Les échantillons biologiques ont concerné essentiellement le sang et les urines (ceux-ci étant prélevés en amont du consentement).

6. Enseignements pour l'étude nationale

6.1 Enseignements techniques et logistiques

6.1.1 Optimisation du matériel

Cinq tubes de prélèvement (trois sortes différents : deux tubes secs de 10 ml, un tube sec élément trace de 6 ml et deux tubes K_2 EDTA de 6 ml) ont été utilisés pour le recueil du sang de cordon.

Pour l'étude à l'échelle nationale, trois tubes seront utilisés : un tube sec élément trace, deux tubes EDTA de manière à obtenir du plasma, du sérum et du sang total. Afin d'optimiser la qualité des prélèvements, il est important de faire le choix des tubes selon des critères bien précis, par exemple, la présence d'activateur de coagulation ou de gel séparateur dans les tubes secs n'est pas souhaitable car cela gênerait certains dosages. Il est aussi important de privilégier des tubes de volume adapté pour un prélèvement optimal, les tubes de 10 ml sont à privilégier. Pour le choix de l'anticoagulant l'EDTA est à privilégier par rapport à l'héparine car la grande majorité des dosages selon les chercheurs se réalisent sur du plasma issu de l'EDTA même si l'on a conscience du manque de plasma hépariné pour quelques dosages.

Pour le recueil urinaire et de lait maternel, les flacons doivent être en polypropylène de haute densité à bout droit avec un bouchon vissant, avec un diamètre à l'ouverture suffisant qui permet un recueil direct. Ce choix des tubes doit se faire en harmonie avec l'EFS pour vérifier que la taille des tubes ne pose pas de problème par rapport aux centrifugeuses et aux automates de l'EFS. Les dimensions des boîtes de stockage doivent être aussi adaptés aux tubes pour optimiser la place dans les congélateurs de l'EFS et aussi optimiser le coût de transport, notamment pour les prélèvements d'urines.

6.1.2 Optimisation des consignes

Formation
Il sera nécessaire d'homogénéiser la formation par un CD-ROM (présentation de l'argumentaire de l'étude, notamment en ce qui concerne les prélèvements biologiques avec visualisation des gestes techniques), ce qui permettra un même degré d'information pour l'ensemble du personnel impliqué dans Elfe, et d'éviter ainsi les relais d'information de second ou de tiers niveau ayant conduit à une dilution des informations (et notamment des sages-femmes recrutées pour Elfe envers les sages-femmes de bloc, qui étaient moins bien informées et non rémunérées).

Recueil
Il faudra tenir compte dans la formulation de ces consignes de la nécessité de :
- prélever immédiatement après section du cordon ;
- clamper le plus près possible du bébé ;
- favoriser l'écoulement direct le plus tôt possible après la naissance ;
- remplir complètement les tubes afin de diminuer le risque d'hémolyse ;
- homogénéiser **uniquement** les tubes EDTA, en les retournant plusieurs fois par un mouvement de retournement lent, sans les agiter trop brutalement ;
- mettre rapidement les tubes à l'abri de la lumière et au réfrigérateur ;
- conserver les tubes à +4 °C de préférence en position verticale.

Traitement, aliquotage et conservation des tubes par l'EFS
Plusieurs laboratoires d'analyses ont été confrontés à un réel problème de volume pour les tests. Certains tubes contenaient moins de 0,5 ml de sérum ou moins de 10 ml d'urines. Ce manque de volume a impliqué une impossibilité à réaliser le dosage ou le contrôle. Il est donc préconisé pour l'étude grandeur nature (nombre d'échantillons très importants) de donner une règle de conduite pour l'aliquotage, par exemple :
- pour les urines à aliquoter en 10 ml, le jeter s'il en reste moins de 5 ml ;
- pour le sang à aliquoter en 0,5 ml, le jeter s'il reste moins de 0,2 ml.

Transport des échantillons de l'EFS vers les laboratoires
Les volumes d'échantillons d'urines à stocker et à transporter vers les laboratoires ont nécessité un nombre élevé de conteneurs ("pool box®"). Il est nécessaire que l'équipe Elfe chargée de la collecte biologique s'associe à l'EFS dans

le choix du matériel d'aliquotage et de stockage de manière à optimiser le volume des boîtes de stockage et de transport.
Tous les échantillons de ce pilote ont été transportés par TSE médical Express dans ces "pool box®" de 49 litres avec insert et sous carboglace et dans des camions réfrigérants dans un délai de 24 heures sauf exception (tempête de neige).

6.1.3 Optimisation du circuit de la collecte et de la traçabilité des échantillons

Le temps de transport ayant influencé la qualité des échantillons, au vu des résultats de l'étude des facteurs préanalytiques était le temps H1 (temps entre le prélèvement et la réception à l'EFS). Ce temps a été en moyenne de 16 heures alors que deux transports étaient prévus par jour (un en matinée et un en après midi pour minimiser ce temps). Il n'aurait donc pas dû excéder 8 heures pour la majorité des échantillons. Le principal problème identifié a été que la sage-femme référente est arrivée parfois à la maternité après la venue du transporteur ou que les prélèvements étaient répartis dans plusieurs réfrigérateurs à des étages différents de la maternité. Celui-ci est donc reparti à vide alors que le réfrigérateur du service contenait bien les échantillons prélevés la veille. Il peut être envisagé de recruter un binôme sage-femme référente et sage-femme de bloc pour optimiser les prélèvements ou d'imposer les horaires compatibles avec l'étude. De plus, la sage-femme référente n'a pas toujours communiqué avec les sages-femmes de bloc et n'a pas toujours anticipé les consignes. De façon générale, elles n'ont pas suivi le circuit des prélèvements de façon optimale (leurs horaires n'étant pas compatibles avec le fonctionnement du bloc) et elles ont rempli de manière incomplète
les feuilles de transmission des prélèvements à l'EFS. Une fiche de transmission complète par type de prélèvement serait souhaitable pour la suite, il est donc important de sensibiliser les sages-femmes à ce problème et de leur en expliciter l'enjeu lors de la formation.

6.1.4 Optimisation du traitement et du stockage

À l'échelle nationale, il sera nécessaire d'assurer la standardisation des tubes d'aliquotage (aliquots à 1 ou 0,5 ml). Pour la numération formule sanguine sur tube EDTA (pour le département de la Seine-Saint-Denis), les tubes ont été trop grands pour l'automate. Les jumeaux seront traités comme deux naissances indépendantes pour faciliter la gestion en amont (matériel et kits de prélèvements spécifiques) et en aval (traitement informatique, traçabilité).

L'EFS a privilégié une partie du stockage (celui à plus long terme) par la mise en paillettes. La conservation en azote liquide permet une conservation de meilleure qualité à long terme [14]. Les mesures de toxiques pour la santé environnement peuvent cependant poser des problèmes particuliers avec ce support. La mise en paillettes permet une automatisation et une identification directe des tubes, ce qui éviterait tout le dispositif d'étiquetage (très fastidieux) et limiterait des coûts logistiques importants. Enfin, les coûts de conservation sont beaucoup plus acceptables (trois fois moins coûteux). Les équipes en santé environnement sont réticentes à l'utilisation exclusive des paillettes en raison des conséquences potentiellement néfastes sur les composés environnementaux à doser. Ce point sera à négocier avec l'EFS selon la possibilité ou non d'automatiser la mise en cryotubes.

Lors des pilotes, des échantillons de sang de cordon et de lait maternel ont été stockés à la fois dans des paillettes et des cryotubes afin de permettre la comparaison entre ces deux contenants : on dispose au maximum de 139 couples paillettes/cryotubes de sérum, 140 couples paillettes/cryotubes de sang total et 56 couples paillettes/cryotubes de lait maternel. Une étude comparative permettra de vérifier que les dosages effectués sont équivalents ou concordants entre prélèvements en paillettes et cryotubes pour le lait maternel et le sang de cordon (étude menée sur des substances dosées par les équipes de nutrition essentiellement).

6.2 Enseignements organisationnels

6.2.1 Nécessité d'une coordination régionale

Pour une étude sur l'ensemble du territoire, un contact physique avec les maternités est indispensable pour motiver les équipes sur le projet. Seule une coordination régionale permettrait de prendre les contacts nécessaires sur place et de gérer le terrain (matériel à envoyer en fonction des particularités locales, consignes à rappeler, suivi du terrain…). Pour rappel, ces consignes seraient plus efficaces si elles étaient harmonisées (réalisation d'un CD pour la formation).

Il faudra privilégier une meilleure formation des sages-femmes de bloc et soigner la communication en amont pour favoriser leur adhésion à l'étude Elfe. Une piste serait une rémunération *ad hoc* des sages-femmes de bloc (ou d'une compensation par service). Il faut obtenir une meilleure adhésion du personnel sur l'étude en terme organisationnel (le personnel doit être mis à disposition durant les quatre jours d'études car ce sont des ETP, les activités de routine engendrent des surcharges de travail non compatibles avec l'étude). Le coordonnateur régional pourra également assumer le travail de contrôle de l'exhaustivité des documents de la collecte (y compris sur les aspects biologiques, en lien avec l'EFS localement).

6.2.2 Nécessité d'améliorer le dispositif pour les cliniques privées

Une attention particulière devra être portée au secteur privé étant donné la qualité plus médiocre des prélèvements dans ce secteur. Pour les maternités privées, la formation devra se faire auprès de l'ensemble des acteurs car ils ne sont pas toujours organisés en staff et en équipes comme dans les services publiques. En effet, il faut tenir compte de l'existence de personnel extérieur (certains obstétriciens pratiquent des accouchements avec leur propre équipe extérieure à la clinique). Le coordonnateur régional pourra jouer un rôle important à ce niveau, localement.

6.2.3 Nécessité d'anticiper le partenariat avec l'EFS

Outre ce travail d'étroite collaboration avec les maternités, le coordonnateur régional aura un rôle actif auprès des partenaires locaux de l'EFS pour s'assurer du bon acheminement des échantillons biologiques. De façon générale, la tournée de transport doit commencer tôt pour être traitée l'après midi. Il peut être envisagé de prévoir une garde de nuit pour la réception des échantillons, l'alternative serait d'envisager la centrifugation sur un site relais de l'EFS pour plus de souplesse au niveau des délais, en respectant le délai d'une centrifugation dans les 24h et un laps de temps plus long (48h) pour la congélation. Ces solutions doivent être discutées au cas par cas avec l'EFS. En amont, le partenariat national doit être suffisamment anticipé par l'équipe projet Elfe. L'activation du réseau national de l'EFS pour le projet en taille réelle nécessite en effet une phase d'organisation importante à mettre en place et ne pourra se faire correctement qu'en 12 mois minimum. A titre d'exemple, les commandes de matériel doivent être réalisées en étroite collaboration avec l'EFS, ainsi que les documents relatifs à l'étude (étiquettes d'identification, les fiches de traçabilité des échantillons…). Cette préparation ne peut s'improviser et doit être mise en place bien en amont. Il s'agit d'un enjeu crucial pour le démarrage de l'étude, le partenariat avec l'EFS étant le point clef de la réussite de la collecte en maternité.

6.3 Enseignements scientifiques

6.3.1 Optimisation du schéma d'aliquotage

Le schéma d'aliquotage du pilote a été volontairement ambitieux (tableau 14) et a été revu à la baisse pour qu'il soit réalisable à la fois en maternité et en traitement sur une étude de grande échelle (tableau 15). Un nouveau schéma peut être proposé à partir de trois tubes initiaux (exemple : un tube sec éléments traces et deux tubes EDTA), soit 20 ml environ. A partir de ces tubes seront aliquotés des tubes d'aliquotage standardisés à 0,5 ml ou 1 ml de différentes matrices : du sérum, du sang total et du plasma. Le sang total a l'avantage de permettre l'extraction d'acide désoxyribonucléique (ADN). Pour le pilote, les prélèvements ont été hiérarchisés avec les différents groupes scientifiques en cas de volume insuffisant.

En maternité, un ordre de priorité de remplissage des tubes a été déterminé en fonction de l'importance des matrices à obtenir (sang total, plasma et sérum) et aussi de l'importance des dosages à réaliser. Ainsi, on peut proposer pour les consignes de remplir par ordre de priorité: un tube sec puis les deux tubes EDTA. Il est à noter que les analyses génétiques ultérieures nécessiteront un tube spécial supplémentaire.

Par ailleurs, il pourra être opportun de garder les échantillons des femmes qui acceptent les prélèvements en phase maternité mais refusent l'étude Elfe (par souci de représentativité).

TABLEAU 14

Taux de réalisation du nombre d'aliquots de sang, urines, cheveux et lait maternel dans le pilote

Taux de réalisation, nombre d'aliquots de sang, d'urines, de cheveux et de lait maternel pour les mères Elfe (N=301)						
Type de prélèvement	Type de matrice	Nbre sujets	Taux réalisation %	Volume (ml)	Nbre aliquots attendus (+biothèque)	Nbre moyen aliquots obtenus
Cheveux	Cheveux	269	89	-	-	-
Tube sec activateur coagulation	Sérum			0,5	18	10
Tube EDTA K_2 "élément trace"	Sang total élément trace	240	82,5	0,5	9	7
	Plasma	214		0,5	6	4
	GR	214		-	4	4
	GB	212		-	3	3
Tube sec "élément trace"	Sérum élément trace	195		0,5	6	3
Urines	Urines	252	84	10	14	11
Lait maternel	Maternité	126	42	0,5	12	10
	Domicile	46	15	10	16	15

TABLEAU 15

Proposition d'un nouveau schéma d'aliquotage

Prélèvement	Matrice	Volume total (ml)	Volume aliquot	Nbre aliquots attendus (+ biothèque)
Sang cordon (20 ml environ)	Sérum	5	0,5	10
	Sang total[a]	6	0,5	12
	Plasma	3	0,5	6

[a] *Dont DNAthèque (aliquots de 0,1 ml et volume total maximum estimé : 0,5 ml).*

TABLEAU 16

Proposition d'un nouveau schéma d'aliquotage

Prélèvement	Matrice	Volume total (ml)	Volume aliquot	Nbre aliquots attendus (+ biothèque)
	Sang total[a]	6	0,5	12
	Plasma	3	0,5	6
Urines de la mère	Urines	100	5	20
Lait maternel	Lait maternité	5	0,5	10

[a] *Dont DNAthèque (aliquots de 0,1 ml et volume total maximum estimé : 0,5 ml).*

Concernant les urines, les hiérarchisations suivantes ont été proposées et validées par les groupes de travail "expositions chimiques" dans les urines (tableau 17) et dans le lait (tableau 18). Les critères de priorisation pour le pilote ont été :

- l'existence de données dans les études précédentes (par exemple, les pyréthrinoides ont été étudiés dans l'Étude nationale nutrition santé [15], Atrazine et Carbamate ont été dosés dans l'étude Pélagie [3] ;
- les effets suspectés de ces substances sur le développement de l'enfant ;
- l'évolution des techniques analytiques (par exemple, les techniques analytiques des PCBs se sont améliorées. On sait doser les dioxines et les PCBs mais on ne dispose pas de données récentes (1998)).

Ces éléments ont permis de hiérarchiser les dosages à effectuer pour le pilote, dans le but de tester la faisabilité des dosages au niveau national (choix des laboratoires, pertinence du dosage).

TABLEAU 17

Hiérarchisation des biomarqueurs dans les urines pour le pilote

Urines	Substances
1	Phtalates
2	Organoétains
3	Bisphénol A
4	Carbamates
5	Atrazine
6	Pyrétrynoïdes
7	Cotinine

TABLEAU 18

Hiérarchisation des biomarqueurs dans le lait pour le pilote

Matrice (lait)	Molécules
1	Retardateurs de flamme bromés
2	Contaminants perfluorés
3	PCBs
4	Dioxines

Les objectifs du pilote étant différents de ceux de l'étude nationale (test de faisabilité), les critères de priorisation devront être revus et discutés biomarqueur par biomarqueur. Ce travail devra se faire en harmonisation avec les objectifs de biosurveillance dans Elfe et ceux des projets de recherche. En effet, il faut tenir compte de la compétition sur les volumes disponibles et le fait que les biomarqueurs seront dosés rapidement après l'inclusion pour les objectifs de biosurveillance alors qu'ils le seront ultérieurement pour les projets de recherche (nécessité d'attendre la survenue de la maladie pour la sélection des cas pour les études cas-témoins nichées dans la cohorte). Une mise en biothèque de 40% des échantillons pour les projets futurs pourrait être un compromis acceptable. Un groupe de travail sera mis en place pour sélectionner et prioriser les biomarqueurs à doser dans Elfe, à valider par un conseil scientifique. Cette priorisation pourra s'appuyer – entre autres – sur les résultats des dosages de ces substances dans le pilote (rapport attendus pour 2011).

Il a été proposé d'abandonner le recueil du "lait mature à domicile", compte tenu des difficultés logistiques de mise en en place ; du faible nombre de retours spontanés (nécessité de rappel téléphonique) et de la sélection de la population (moins d'un tiers des femmes allaitent à 1 mois et ont assez de lait pour ce prélèvement). Le prélèvement veineux maternel (recueil de 20 ml) pourrait alors être destiné en priorité aux composés ne pouvant être dosés dans le lait maternel, et permettrait par ailleurs les dosages à visée génétique. Les polluants organiques persistants pourront également être dosés préférentiellement dans le sang ; le lait maternel étant peu chargé en graisse à la sortie de la maternité (10 ml sont nécessaires *a minima*) et ne pourra concerner que les mères ayant pu recueillir ce volume (sélection de la population).

6.3.2 Optimisation du nombre de prélèvements

Collecte de sang

Concernant la collecte de sang de cordon, deux projets – *a minima* – nécessitent l'ensemble de la cohorte : il s'agit du projet CMV et celui de la plombémie à la naissance. Ainsi, pour l'étude des déterminants des niveaux élevés de plombémie à la naissance, les facteurs étudiés seront le fait d'avoir réalisé des travaux dans un habitat ancien, le fait d'utiliser des céramiques artisanales (population marocaine essentiellement), l'exposition professionnelle, etc. On se trouve donc confrontés à des facteurs d'exposition rares, avec une prévalence d'exposition que l'on peut estimer autour de 1 % (au maximum). Le nombre de sujets nécessaire est calculé pour une régression logistique dans laquelle on estime la probabilité d'avoir un niveau de plomb au-delà du percentile 95. Ainsi, si la prévalence d'exposition est de 0,5 %, l'OR attendu de 3, la puissance de 80 % et un risque α de 5 %, il faut inclure près de 19 100 sujets.

Collecte des urines

Un des objectifs de la cohorte ELFE est l'étude du rôle des expositions environnementales – notamment à des polluants neurotoxiques et perturbateurs endocriniens prénatales – sur un certain nombre de pathologies qui peuvent en résulter (tableau 19). Cette problématique nécessite un nombre de sujets *ad hoc* (calcul fait par Sylvaine Cordier *et al*).

TABLEAU 19

Nombre de cas attendus dans la cohorte

Pathologie étudiée	Nombre attendu
Cryptorchidie/hypospadias (naissance)	300
Puberté précoce (filles avant 9 ans)	20-40
Syndrome d'hyperactivité (0-15 ans)	800

La taille de cette cohorte permet *a priori* d'envisager d'étudier des effets rarement accessibles à des études incluant un recueil prospectif des expositions et des événements de santé. Les effets étudiés sont les atteintes au développement neurocomportemental de l'enfant (syndrome d'hyperactivité et déficit de l'attention, développement cognitif…) et les pathologies potentiellement associées à des perturbations hormonales *in utero* (malformations de l'appareil génital mâle, cancer testiculaire, puberté précoce…).

Le calcul du nombre attendu montre que si la taille de la cohorte (biologique) est réduite, il sera possible d'étudier le rôle des facteurs environnementaux sur le syndrome d'hyperactivité et de mettre en relation des expositions fréquentes (insecticides par exemple) si l'on utilise des mesures continues comme les scores sur les tests psychométriques ou le score de maturation sexuelle à un âge donné. En revanche, la puberté précoce ne pourra être étudiée que sur la totalité de la cohorte mais avec une puissance limitée.

Les anomalies congénitales de l'appareil génital male sont des malformations visibles à la naissance dont la prévalence augmente dans les pays industrialisés et qui ont permis de mettre en évidence le rôle de l'exposition prénatale à des produits dits perturbateurs endocriniens [16]. Ces mêmes produits pourraient également être responsables d'une baisse de la fertilité chez l'homme. Parmi ces malformations, la cryptorchidie (testicules non descendus) est la plus fréquente. Les équipes impliquées dans Elfe tablent sur une prévalence de 3 % des garçons. En l'absence de données précises en France sur les expositions des femmes enceintes à des produits perturbateurs endocriniens tels que les retardateurs de flamme bromés ou les phtalates ; il est nécessaire de se baser sur les résultats d'autres études européennes pour évaluer la puissance des études d'association avec la cryptorchidie (tableau 20).

TABLEAU 20

Etudes européennes de l'association perturbateurs endocriniens et cryptorchidies

Étude mettant en évidence une association	Nombre étudiés
Main *et al* (2007) [17]	95 cas et 185 témoins
Fernandes *et al* (2007) [18]	50 cas et 110 témoins
Longnecker *et al* (2002) [19]	219 cas et 552 témoins
Damgaard (2006) [20]	62 cas et 68 témoins

Si l'on fait l'hypothèse que les niveaux d'exposition aux perturbateurs endocriniens en France sont comparables à ceux d'autres régions d'Europe et/ou si l'on se place dans des régions plus susceptibles d'être concernées par ces expositions (régions agricoles), il semble donc possible de mettre en évidence des associations significatives avec le risque de cryptorchidie avec des effectifs de l'ordre de 100 garçons, soit sur un tiers de la cohorte.

Il est donc souhaitable que les prélèvements puissent être effectués et stockés pour environ **7 000 enfants**. Ce calcul se base sur les informations actuelles sur la toxicité des produits déjà connus et doit laisser ouverte la possibilité de mettre en évidence le rôle d'expositions "émergentes" ou qui ne seront connues que plus tard et pour lesquelles le risque serait moins élevé ou aussi d'évaluer les risques associés à des mélanges d'exposition. Pour tenir compte du fait qu'un pourcentage des enfants sera probablement perdu de vue au cours du suivi et qu'un suivi à long terme (10-15 ans) est nécessaire pour l'évaluation des atteintes du développement psychomoteur ou de la maturation sexuelle, un échantillon de 10 000 recueil urinaires des enfants serait satisfaisant. Les équipes impliquées sur cette problématique dans Elfe ont proposé de sur-échantillonner les maternités couvrant des régions dans lesquelles sont présents des produits évoqués dans ce projet comme les pesticides (ex : Languedoc-Roussillon, Bordelais, Bretagne/Normandie), voire de bien inclure un protocole standardisé de l'examen génital du petit garçon dans toutes les maternités incluses.

Il n'est pas réaliste de garder la totalité des maternités pour le recueil des prélèvements biologiques, du moins pour ce qui concerne les prélèvements des urines (dosages de polluants environnementaux). Le coût logistique et organisationnel pour des prélèvements effectués dans des maternités isolées où le nombre d'accouchements est faible (<500 accouchements/an) n'est par ailleurs pas satisfaisant au regard des investissements logistiques déployés. La faisabilité d'un plan de sondage sur les urines a été testée en regard des expositions aux pesticides mais ne s'est pas avérée pertinente dans la mesure où pratiquement la France entière (sauf les régions montagneuses étaient surreprésentées). En conséquence, il a été décidé de réaliser le plan de sondage proportionnel à la taille des maternités et d'optimiser ce plan de sondage avec l'EFS selon la proximité des centres de traitement des prélèvements.

6.3.3 Plan de sondage pour les urines

Pour des raisons logistiques (stockage trop volumineux, organisation logistique en maternité et transport des échantillons) et de coût, les urines ne seront prélevées que pour un sous-échantillon des naissances inclues dans Elfe. L'objectif est donc de sélectionner un sous-échantillon de naissances pour lesquels on souhaite effectuer des prélèvements biologiques en maternité. L'estimation du nombre de sujets à inclure et les modalités de sélection ont fait l'objet d'un travail spécifique respectant les propositions des équipes concernées par les prélèvements. Concernant le nombre de sujets nécessaires, chaque groupe a évalué le nombre de sujets nécessaires à son projet en collaboration avec l'équipe projet. Ces calculs ont conditionné l'étape d'échantillonnage des maternités dans lesquelles des prélèvements d'urines seront réalisés.

Concernant le nombre de sujets nécessaires pour les urines, une première estimation de 7 000 sujets permettrait d'étudier les facteurs neurotoxiques et le développement psychomoteur (variable quantitative) et reprotoxiques par cryptorchidies. Les objectifs de recherche et de surveillance ne sont pas les mêmes (volonté d'avoir un nombre suffisant de cas versus représentativité de l'échantillon). La proposition serait de garder la représentativité au maximum et de prendre un échantillon de 7 à 10 000 sujets pour avoir un nombre de cas suffisant en tenant compte de l'attrition.

L'ensemble des naissances les jours "Elfe" représente un effectif d'environ 33 000 naissances. On souhaite au final obtenir un échantillon de 10 000 prélèvements. On suppose un taux d'acception d'Elfe de 60 %, l'objectif est donc de cibler 17 000 prélèvements réalisés à la naissance.

Il est à noter que le plan de sondage qui suit est une première proposition qui sera rediscutée notamment en fonction de l'évolution du plan d'échantillonnage général de la cohorte. On suppose ici que pour Elfe sont incluses toutes les naissances survenues pendant 16 jours donnés de l'année (répartis en 4x4 jours à chaque trimestre), ce qui correspond à l'échantillon démographique permanent de l'Insee. Les enfants sont inclus à la naissance dans toutes les maternités de France. On cherche donc à sélectionner un sous-échantillon parmi ces maternités.

La base de sondage utilisée contient la liste actuelle des 539 maternités répertoriées en France métropolitaine. On dispose pour ces maternités du nombre de naissances survenues en 2006 ou 2007.

La solution mise en place est un sondage à deux degrés avec un 2^{e} degré exhaustif (sondage en grappe), dans lequel on sélectionnerait tout d'abord des maternités (unités primaires) avant de sélectionner toutes les naissances (unités secondaires) dans ces maternités. Le sondage en grappes est en effet le plus adapté : même s'il ne s'agit pas de la meilleure solution théorique pour un tirage à deux degrés d'un point de vue statistique, c'est la meilleur en pratique

d'un point de vue coût et logistique, car c'est surtout le premier degré (maternités) qui coûte cher. Cette méthode permet en effet de concentrer la collecte. On y gagne en besoin de formation dans les maternités et surtout en coût de transport des prélèvements. Le coût est par ailleurs directement lié à la taille des maternités et diminue avec la taille des maternités. Par ailleurs, les maternités sont de tailles très différentes (nombre de naissances par an variant de 10 à 5000) et la taille pouvant par ailleurs être reliée à des caractéristiques des populations, l'équipe Elfe a mis en place une stratification selon la taille des maternités.

Allocation au sein des strates (tableau 21) :

- tirage proportionnel : on cherche à conserver la répartition du nombre de naissances dans chaque strate. L'avantage est que les poids de sondage sont égaux pour chaque maternité échantillonnée, mais au détriment d'une inclusion d'un plus grand nombre de maternité. On ne tient pas ici compte des coûts élevés dans les petites maternités. On tire un total de **275 maternités** ;
- tirage d'un nombre de maternité proportionnel au nombre de naissance dans la strate. L'avantage est que l'on concentre la collecte (moins de maternités échantillonnées et on favorise les grandes maternités). Ceci se fait cependant au prix d'une plus forte dispersion des poids (de 1 à 10). Total de **202 maternités** ;
- la meilleure solution est de faire un compromis entre ces deux méthodes : par exemple, se fixer une limite de rapport de poids à 5-6 ce qui augmente le nombre de petites maternités échantillonnées. Total de **208 maternités**.

Tirage en pratique : Le tirage sera réalisé une fois la base des maternités consolidées par les coordonateurs régionaux, à la fois en termes de maternités ouvertes et de nombre de naissances actualisé. On utilisera, soit la macro SAS cube pour échantillonnage équilibré, soit les procédures plus classiques de SAS (surveyselect). La première méthode aurait l'avantage de contrôler le nombre de naissances échantillonnées et de pouvoir éventuellement contrôler d'autres facteurs (statut, niveau de la maternité, rural/urbain, etc).

TABLEAU 21

Proposition d'échantillonnage pour un plan stratifié selon la taille des maternités pour un objectif de 17 000 naissances

Strate	Base de sondage				Allocation proportionnelle			Allocation proportionnelle au nombre de naissances de la strate		
	Nombre de maternités	%	Nombre de naissances	%	N	poids	Nombre de naissances	N	poids	Nombre de naissances
<500 naissances par an	57	10,58	920	2,8	29	1,96	470	11	5,19	178
500-749 naissances par an	75	13,91	2 074	6,2	38	1,96	1 059	13	5,96	348
750-999 naissances par an	85	15,77	3 279	9,8	43	1,96	1 674	20	4,27	768
1000-1249 naissances par an	75	13,91	3 681	11,1	38	1,96	1 879	22	3,36	1 096
1250-1499 naissances par an	51	9,46	3 087	9,3	26	1,96	1 576	19	2,72	1 134
1500-1749 naissances par an	39	7,24	2 751	8,3	20	1,96	1 404	17	2,34	1 178
1750-1999 naissances par an	36	6,68	2 996	9,0	18	1,96	1 529	18	1,98	1 513
2000-2499 naissances par an	57	10,58	5 604	16,8	29	1,96	2 860	34	1,68	3 343
2500 naissances par an et plus	64	11,87	8 912	26,8	33	1,96	4 549	54	1,18	7 530
Total	**539**	**100**	**33 306**	**100**	**275**		**17 000**	**208**		**17 087**

7. Conclusion

L'étude pilote a permis de valider l'organisation, l'acceptabilité, la faisabilité des prélèvements biologiques en maternité ainsi que la qualité du recueil, pour l'ensemble des phases de la collecte, y compris lors de l'analyse des premiers dosages. On a obtenu un taux de réalisation supérieur à 80 % en moyenne pour l'ensemble des maternités. Toutefois, les écueils rencontrés lors de ce pilote ont permis de relever un certain nombre de pistes d'amélioration pour redimensionner l'étude au niveau national. Les points développés concernent la logistique, tant sur le choix du matériel qu'il faudra standardiser en harmonie avec les contraintes des centrifugeuses et automates de l'EFS, que sur le recueil lui-même (homogénéisation des formations de sages-femmes, amélioration des consignes), ou l'aliquotage (établissement de règles d'aliquotage) et le transport.

Sur le plan organisationnel, la mise en place d'une coordination au niveau régional sera indispensable au niveau national pour prendre les contacts nécessaires sur place et gérer le terrain. Le recours à un prestataire permettra de gérer les aspects logistiques et l'envoi de matériel notamment. Il sera primordial de soigner l'adhésion et l'implication des sages-femmes de bloc (binôme de responsabilité avec la sage-femme référente, rémunération ad hoc ou compensation pour le service impliqué). Le personnel doit être mis à disposition les quatre jours d'études autant que possible. En amont, le partenariat doit être suffisamment anticipé par l'équipe projet Elfe. L'activation du réseau national de l'EFS pour le projet en taille réelle nécessite une coordination étroite entre l'équipe Elfe et l'EFS, partenariat qui – avec l'implication des sages-femmes – reste la clé de voûte de la réussite de la collecte en maternité. Sur les aspects scientifiques, le nombre de sujets nécessaires a permis d'estimer une collecte d'urines pour 10 000 sujets et pour le sang de cordon sur l'ensemble de l'échantillon (entre autres pour satisfaire les projets CMV et plomb). Si la piste de nouveaux prélèvements (par exemple, le sang veineux de la mère) devait être retenue, les conséquences budgétaires et logistiques entraîneraient une revue à la baisse du nombre de collecte de sang de cordon à la naissance, ce qui doit faire l'objet d'une nouvelle discussion avec les équipes impliquées, notamment concernant les dosages du CMV et du plomb dans la cohorte. Le plan de sondage pour les prélèvements a permis d'optimiser le choix des maternités en fonction de la taille (et du nombre de naissances attendues) et donc des contraintes logistiques à mettre en place. Il sera discuté avec l'EFS pour l'optimiser en tenant compte également du paramètre de proximité avec les centres de traitement des échantillons. Quelles que soient les demandes initiales des équipes, les tubes ne seront pas prédéfinis mais standardisés sur l'ensemble des matrices nécessaires (plasma, sang total, sérum, lait maternité, urines…).

Un comité sera mis en place pour sélectionner ultérieurement les demandes motivées à la fois par des objectifs de biosurveillance (dosages immédiats) et par des objectifs de recherche (dosages ultérieurs). Il sera ainsi possible de réguler l'accès aux données biologiques, en tenant compte du caractère consomptible de ces échantillons biologiques. Plus d'un tiers sera conservé en biothèque (idéalement 40%) pour des projets non encore définis à ce jour.

Enfin, le dernier point concernant les enseignements scientifiques porte sur les résultats des dosages de ces échantillons qui permettront une analyse descriptive, donnant quelques indications sur les seuils attendus des polluants, ce qui permettra d'orienter la réflexion sur la sélection et la priorisation des biomarqueurs à la naissance dans Elfe, et donnera ainsi une première estimation de l'imprégnation des mères (puis des bébés) à ces substances. Ces résultats feront l'objet d'un rapport disponible en 2011 : "Enseignements des dosages des biomarqueurs environnementaux en maternité de l'étude pilote Elfe".

8. Perspectives

L'étude pilote a été réalisée fin 2007 et répondait à des objectifs initiaux essentiellement de faisabilité, au regard des demandes émanant des différentes équipes ayant répondu à l'appel à projets. Elle a permis de valider le circuit des données biologiques pour les éléments recueillis et de tirer profit des enseignements pour la suite. D'autres prélèvements, qui n'ont pas fait l'objet de demandes à ce jour, peuvent toutefois être importants à considérer pour la suite dans une cohorte de cette ampleur, notamment au vu de la littérature internationale et des recommandations sur la nature des collectes biologiques mises en place dans ce type d'étude [21]. À ce titre, le sang veineux maternel permettra de couvrir les aspects génétiques, même si ces derniers n'ont pas été prévus dans ce pilote en l'absence de projets porteurs de la thématique. Il faut souligner l'importance de prévoir une banque d'ADN et donc les aspects

de collecte s'y rapportant (tube supplémentaire en maternité à envisager, l'extraction centrale serait une piste à privilégier...). Par ailleurs, d'autres matrices pourraient être intéressantes sur un sous-échantillon et sont des pistes prometteuses pour l'avenir, notamment le recueil du méconium ou de fragments de tissus (cordon) qui pourraient être explorées [22].

Références bibliographiques

[1] Vandentorren S, Bois C, Pirus C, Sarter H, Salines G, Leridon H. Rationales, design and recruitment for the Elfe longitudinal study. BMC Pediatr 2009;9:58.

[2] Drouillet P, Forhan A, uzon-Guillain B, Thiebaugeorges O, Goua V, Magnin G *and al.* Maternal fatty acid intake and fetal growth: evidence for an association in overweight women. The 'EDEN mother-child' cohort (study of pre- and early postnatal determinants of the child's development and health). Br J Nutr 2009;101(4):583-91.

[3] Guldner L, Monfort C, Rouget F, Garlantezec R, Cordier S. Maternal fish and shellfish intake and pregnancy outcomes: a prospective cohort study in Brittany, France. Environ Health 2007;6:33.

[4] Foster MW, Sharp RR. Will investments in large-scale prospective cohorts and biobanks limit our ability to discover weaker, less common genetic and environmental contributors to complex diseases? Environ Health Perspect 2005;113(2):119-22.

[5] Fall CH. The fetal and early life origins of adult disease. Indian Pediatr 2003;40(5):480-502.

[6] Favier M, Hininger-Favier I. [Is systematic iron supplementation justified during pregnancy?]. Gynecol Obstet Fertil 2004;32(3):245-50.

[7] Woods JR Jr., Plessinger MA, Miller RK. Vitamins C and E: missing links in preventing preterm premature rupture of membranes? Am J Obstet Gynecol 2001;185(1):5-10.

[8] Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. Mol Med Today 1995;1(9):418-23.

[9] Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Bellisle F. Increasing prevalence of obesity among 18-years-old males in Sweden: evidence for early determinants. Acta Paediatr 1999;88(4):365-7.

[10] Grandjean P, Weihe P, Burse VW, Needham LL, Storr-Hansen E, Heinzow B *and al.* Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. Neurotoxicol Teratol 2001;23(4):305-17.

[11] Wigle DT, Arbuckle TE, Turner MC, Berube A, Yang Q, Liu S *and al.* Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2008;11(5-6):373-517.

[12] Seminara D, Khoury MJ, O'Brien TR, Manolio T, Gwinn ML, Little J *and al.* The emergence of networks in human genome epidemiology: challenges and opportunities. Epidemiology 2007;18(1):1-8.

[13] Lengelle J, Panopoulos E, Betsou F. Soluble CD40 ligand as a biomarker for storage-related preanalytic variations of human serum. Cytokine 2008;44(2):275-82.

[14] Lehmann S, Roche S, Allory Y, Barthelaix A, Beaudeux JL, Berger F *and al.* [Preanalytical guidelines for clinical proteomics investigation of biological fluids]. Ann Biol Clin (Paris) 2009;67(6):629-39.

[15] Castetbon K, Vernay M, Malon A, Salanave B, Deschamps V, Roudier C *and al.* Dietary intake, physical activity and nutritional status in adults: the French nutrition and health survey (ENNS, 2006-2007). Br J Nutr 2009;102(5):733-43.

[16] Paulozzi LJ. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. Environ Health Perspect 1999;107(4):297-302.

[17] Main KM, Kiviranta H, Virtanen HE, Sundqvist E, Tuomisto JT, Tuomisto J *and al.* Flame retardants in placenta and breast milk and cryptorchidism in newborn boys. Environ Health Perspect 2007;115(10):1519-26.

[18] Fernandez MF, Olmos B, Olea N. [Exposure to endocrine disruptors and male urogenital tract malformations [cryptorchidism and hypospadias]]. Gac Sanit 2007;21(6):500-14.

[19] Longnecker MP, Klebanoff MA, Brock JW, Zhou H, Gray KA, Needham LL *and al.* Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and risk of cryptorchidism, hypospadias, and polythelia among male offspring. Am J Epidemiol 2002;155(4):313-22.

[20] Damgaard IN, Skakkebaek NE, Toppari J, Virtanen HE, Shen H, Schramm KW *and al.* Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. Environ Health Perspect 2006;114(7):1133-8.

[21] Jones R, Golding J. Choosing the types of biological sample to collect in longitudinal birth cohort studies. Paediatr Perinat Epidemiol 2009;23 Suppl 1:103-13.

[22] Fukata H, Omori M, Osada H, Todaka E, Mori C. Necessity to measure PCBs and organochlorine pesticide concentrations in human umbilical cords for fetal exposure assessment. Environ Health Perspect 2005;113(3):297-303.

[23] Yazbeck C, Cheymol J, Dandres AM, Barbéry-Courcoux AL. Intoxication au plomb chez la femme enceinte et le nouveau-né : bilan d'une enquête de dépistage. Arch Pediatr 2007;14 (1):15-9.

[24] Dragos S, Cuesta J, Topuz B, Rivera L. Étude de prévalence des plombémies élevées chez les nouveau-nés, Seine-Saint-Denis, décembre 2005 – juillet 2006 (Poster). Journées de veille sanitaire. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2006. Disponible à partir de l'URL : http://www.invs.sante.fr

Annexes

Annexe 1 - note explicative sur les prélèvements biologiques

Annexe 2 - Recueil du lait maternel dans l'étude Elfe

Annexe 2 bis - Recueil des cheveux de la mère dans l'étude Elfe

Annexe 3 - Lettre de consentement

Annexe 4 - Affiche prélèvements

Annexe 5 - Lettre d'information de la mère

Annexe 6 - Fiche de transmission des prélèvements

Annexe 6 bis - Fiche de transmission des prélèvements

Annexe 7 - Schéma d'aliquotage du pilote 2007

Annexe 7 bis - Schéma d'aliquotage du pilote 2007

Annexe 1 - Note explicative sur les prélèvements biologiques

Recueils biologiques dans l'étude Elfe

Pourquoi recueillir le sang du cordon, les urines, les cheveux et le lait maternel ?

On sait maintenant que le fœtus est particulièrement sensible durant la grossesse à diverses substances ingérées par la mère, qu'elles soient alimentaires, chimiques ou biologiques. Les recueils biologiques permettront de repérer la présence de ces substances et de mesurer ensuite leurs éventuels aspects toxiques, nutritionnels et infectieux.

La **nutrition** pendant et après la grossesse est essentielle. Si elle est inadaptée, elle peut affecter la santé de l'enfant, de l'adolescent et de l'adulte, et favoriser la survenue de pathologies comme le surpoids ou le diabète. Un excès de calories, de certaines graisses ou de fer, une insuffisance de vitamines A, C et E, de sélénium, de zinc ou de fer, peuvent favoriser l'apparition de complications de la grossesse et jouer sur le développement de l'enfant.

Les **expositions environnementales** in utero peuvent aussi avoir un impact important sur la santé des enfants. Les effets de diverses substances neurotoxiques (plomb, mercure, PCB, pesticides) et leurs interactions, à ce jour mal connus, pourront être étudiés grâce au recueil d'un ensemble de substances présentes dans le sang, les urines, le lait ou les cheveux.

Nous vous remercions donc de bien vouloir accepter ces prélèvements et de participer ainsi au progrès des connaissances médicales sur des sujets très importants pour la santé des enfants.

Annexe 2 - Recueil du lait maternel dans l'étude Elfe

Pourquoi recueillir mon lait ?

L'analyse de la composition du lait maternel dans le cadre de l'étude Elfe permettra de mettre en évidence, par traitement statistique des données, les éléments apportés par le lait maternel dans la protection contre certaines maladies et de définir les doses optimales pour le bon développement de l'enfant. Ces données pourraient être exploitées par exemple pour la conception de substituts de lait plus adaptés à une bonne santé.

D'autres analyses permettront de mieux connaître la présence de contaminants chimiques dans le lait maternel. Une meilleure interprétation des données ainsi collectées en termes de risque éventuel lié à la présence de ces substances sur le développement des allergies, par exemple, sera alors possible. Ces données pourraient orienter les politiques de santé visant à mettre en place des mesures de protection pour les mères et leurs enfants.

Quand recueillir mon lait ?

Le lait pourra être recueilli 1 mois après la naissance, quand la lactation est bien mise en place. Le lait peut être recueilli en plusieurs fois : après la tétée, une fois que le bébé a été nourri, de préférence toujours à la même heure de la journée.

Comment recueillir mon lait ?

- Avant le recueil
  - Se laver les mains et le sein et les rincer abondamment à l'eau claire.
  - Si vous utilisez habituellement un tire-lait, celui-ci doit être bouilli ou bien rincé abondamment à l'eau claire. Celui-ci ne doit pas être stérilisé à froid avec des pastilles de chlore.
  - Evitez d'utiliser une crème sur les seins, mais si vous devez le faire, faites-le de façon éloignée dans le temps par rapport au moment ou vous allez faire le recueil de lait et rincer abondamment le sein à l'eau avant le recueil de lait.
- Pendant le recueil
  - La quantité optimale de lait demandée est de 160 ml. Elle correspond au remplissage aux trois-quarts du flacon.
  - Ce flacon a été traité spécialement pour cette étude et vous ne devez en faire aucun autre usage.
  - La quantité de lait demandée peut être obtenue en plusieurs séances de lactation, soit en utilisant un tire-lait et en transvasant le lait ensuite dans le flacon, soit en pressant le sein et en recueillant alors le lait directement dans le flacon. Vous ne pouvez pas utiliser des coquilles pour cette étude.
  - Aucun autre récipient autre que le récipient du tire-lait ne doit être utilisé pour le recueil du lait.
  - Entre chaque période de recueil, le flacon doit être conservé au congélateur. Rajoutez à chaque fois le nouveau lait que vous avez recueilli sur le lait déjà congelé et remettez-le tout au congélateur.
- Après le recueil
  - Quand la quantité totale de lait nécessaire à l'étude a été recueillie :
    - ➢ Refermez le flacon de lait correctement ;
    - ➢ Glissez le flacon dans la pochette zip ;
    - ➢ Entourez la pochette zip avec le papier absorbant et le papier bulle ;
    - ➢ Glissez-le tout dans le carton d'expédition dans la boîte en carton et refermez la boite soigneusement ;
    - ➢ Envoyez la boîte en carton par la poste (vous n'avez pas besoin d'affranchir).

Remarque : une fois congelé, le lait ne doit pas être décongelé.

Merci de votre participation.

Annexe 2 bis - Recueil des cheveux de la mère dans l'étude Elfe

Cheveux de la mère

- Le prélèvement est réalisé à l'aide de ciseaux (à bouts ronds si possible) dans la région occipitale, à la racine des cheveux en ne conservant que les 5 premiers cm avec une mèche d'un diamètre d'environ 2-3 mm.
- Après sa coupe, la mèche sera orientée (racine-extrémité), agrafée sur le papier bristol (écrire "racine" sur le bristol pour le côté racine agrafé) et placée dans l'enveloppe. En cas de cheveux courts, indiquer la longueur initiale en cm des cheveux prélevés.
- Remplir la date et l'heure du prélèvement sur l'étiquette Elfe prévue à cet effet "Chev".
- Coller l'étiquette ELFE "Chev" sur le carton bristol destinés au prélèvement de cheveux et une étiquette "réserve" sur l'enveloppe.
- Remplir la fiche de transmission des prélèvements (cheveux et lait maternel), la remettre dans l'enveloppe.
- Mettre l'enveloppe incluant la fiche de transmission dans le réfrigérateur

N.B. : Pour éviter les "trous" inesthétiques, il est possible de prélever plusieurs mèches à des endroits différents de la tête. Ces mèches seront alors orientées dans le même sens avant d'être agrafées sur le bristol. Elles pourront être agrafées séparément si cela s'avère plus facile techniquement. Dans ce cas, l'examinateur prendra soin de bien orienter chaque mèche (désigner le côté racine pour chaque mèche).

Annexe 3 - Lettre de consentement

CONSENTEMENT DE PARTICIPATION À l'ÉTUDE ELFE
(Analyses biologiques et biothèque - mère)

de
Mme……
…….. (nom, prénom)
demeurant à .....
.....
certifie avoir lu et compris la lettre d'information qui m'a été remise par la sage-femme
……...……...…….

J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais et j'ai disposé d'un délai de réflexion suffisant avant de prendre ma décision.

J'ai reçu et j'ai bien compris les informations suivantes :

L'objectif est de tester la faisabilité des prélèvements et des dosages biologiques dans une étude de suivi d'enfants de la naissance à l'âge adulte, l'Etude longitudinale française de l'enfance (Elfe). Cette étude va permettre d'étudier l'impact de différents facteurs (facteurs familiaux, sociaux, environnementaux, scolaires, comportementaux, sanitaires, nutritionnels) sur l'état de santé de l'enfant ainsi que sur son développement physique et moteur.

Ma participation à l'étude comprendra des recueils d'informations (questionnaires) et des recueils biologiques (200 ml d'urines, 30 ml de sang du cordon, si possible 60 cheveux et 5 ml de lait maternel).

Le dépistage d'une infection à cytomégalovirus sera réalisé sur le sang du cordon prélevé lors de l'accouchement. Cette infection rare et le plus souvent bénigne peut avoir des conséquences sur le nouveau-né, notamment sur son audition. En cas de positivité, le résultat me sera communiqué par téléphone par le médecin qui aura fait l'analyse et qui répondra à toutes les questions que je me pose. Ce résultat sera également adressé au médecin de mon choix. Un dosage du plomb sera réalisé dont le résultat me sera communiqué. En cas de valeurs anormales, une lettre sera remise au médecin qui me suit.

Le reste des prélèvements biologiques sera conservé afin de constituer une collection biologique ou biothèque en vue d'analyses ultérieures qui ne serviront qu'à la recherche. La finalité de cette biothèque est de disposer de matériel biologique pour réaliser des analyses non prévues à ce jour et permettant de répondre à des problèmes de santé émergents dans les domaines de la santé, la nutrition ou de l'environnement. S'il s'agit d'autres domaines, les investigateurs me contacteront pour obtenir mon consentement sur la base d'une information précise des analyses à réaliser. Une extraction d'ADN est envisagée à des fins génétiques pour des études ultérieures. Le sang, les urines et les cheveux seront conservés dans des tubes numérotés, mais ne comportant aucune indication nominative me concernant. Ces tubes seront conservés dans des congélateurs fermés à clés accessibles au seul promoteur où aux personnes dûment mandatées par lui, et éventuellement par des représentants des autorités administratives de santé.

Les données seront transmises pour analyses statistiques aux chercheurs impliqués dans cette étude. Les analyses statistiques et biologiques pourront être faites en collaboration avec des laboratoires français ou étrangers, privés ou publics, dans le plus strict respect de l'anonymat.

Si je le désire, je serai libre à tout moment d'arrêter ma participation sans que cela change mes relations avec l'équipe soignante ni sur la prise en charge de mon enfant. J'en informerai alors le promoteur de l'étude : l'Institut de veille sanitaire par le bureau Elfe (dont les coordonnées figurent sur la lettre d'information) et pourrai alors demander la destruction des différents échantillons prélevés.

J'ai eu l'assurance que les décisions qui s'imposent pour la santé de mon enfant seront prises à tout moment, conformément à l'état des connaissances actuelles.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement informatisé en conformité avec les dispositions de la loi n°2004-801 du 6 août 2004 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. J'ai bien noté que le droit d'accès prévu par la loi "informatique et Libertés" (article 40), s'exerce à tout moment auprès du bureau Elfe, Institut national d'études démographiques, 133 Boulevard Davout, 75980 PARIS CEDEX 20, tel : +33(0)1.56.06.21.01/41 et que je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de celui-ci.

L'Institut de veille sanitaire (InVS) est le promoteur de la partie prélèvements biologiques de cette étude. Il a souscrit un contrat d'assurance de responsabilité civile conformément aux dispositions de l'article 207-7 du code de la Santé publique du 20 décembre 1988 modifiée, et de l'article 5 du 5 juillet 1994 :
Compagnie d'assurance : la société **AXA**
Numéro de référence du contrat : police n° **1745153504**
Cette étude a été approuvée par le Comité de protection des personnes – Ile-de-France IX qui a émis un avis favorable à sa réalisation le 2 juillet 2007.

Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles. **Je n'autorise leur consultation que par des personnes qui collaborent à la recherche.** Celles-ci, soumises à l'obligation du secret médical, sont désignées par l'organisateur, éventuellement, un représentant des Autorités de Santé (personne mandatée par le Directeur général de la santé). Je suis informée que les données qui me concernent sont enregistrées sur un fichier informatique confidentiel selon les conditions édictées par la loi informatique et liberté. **Je pourrai avoir accès, si je le désire, aux données qui me concernent, les faire rectifier et éventuellement supprimer si je ne désire plus participer à l'étude**.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. **Je conserve tous mes droits garantis par la loi.**

J'accepte de participer dans les conditions précisées ci-dessus :

□ **PARTICIPATION À L'ENQUETE PILOTE ELFE**
□ **PARTICIPATION AU RECUEIL BIOLOGIQUE**
□ **PARTICIPATION À LA "COLLECTION BIOLOGIQUE"**
□ **PARTICIPATION AUX ETUDES GENETIQUES ULTERIEURES**

Fait à ……..le……..
Signature (mention : "lu, compris et approuvé")

Je pourrai à tout moment demander toute information complémentaire aux médecins de l'équipe Elfe : Tél : 01 56 06 21 01

Je soussignée, *(nom et qualité du professionnel de santé)*……., certifie avoir communiqué toute information utile concernant cette étude. Je m'engage à faire respecter les termes de cette note de consentement, conciliant le respect des droits et des libertés individuelles et les exigences d'un travail scientifique.

Fait à …… le……
Signature

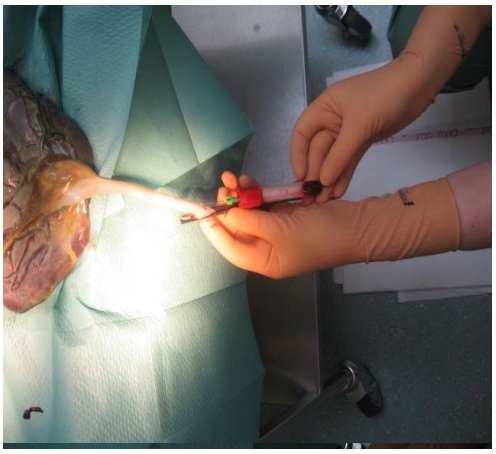
Un exemplaire cosigné sera remis à la femme qui participe à la recherche.

Annexe 4 - Affiche prélèvements

- **Prendre une pochette Ined *(ou pochette jumeau si naissance gémellaire)* et le cahier d'enregistrement Elfe**
  - 5 tubes sang dans un sac zip
  - 1 tube urine dans un sac zip
  - 1 aiguille et 1 corps de prélèvement
  - 1 sac plastique (pour la pesée du placenta)
  - 2 planches d'étiquettes
    - 1 petite planche étiquettes mère - enfant
    - 1 grande planche étiquettes prélèvements

  agrafée avec la fiche de transmission des prélèvements

Photo prise au CHRU de Lille – hôpital Jeanne de Flandre



- **Recueil de 200 ml d'urine**
  - dès l'admission, si possible
  - ou en salle de naissance lors du sondage, s'il existe
- **Recueil du sang de cordon**
  - Prélever immédiatement après la naissance
  - Clamper le plus près possible du bébé
  - Prélever avec l'aiguille
    - Au plus près de la pince
    - En déclive (comme photo ci-jointe)
  - Remplir les 5 tubes par ordre de priorité
  - le premier tube sec de 10 ml (rouge)

1. le tube EDTA « traces éléments » de 6 ml (bleu)
2. le second tube EDTA « traces éléments » de 6 ml (bleu)
3. le second tube sec de 10 ml (rouge)
4. le tube sec « traces éléments » 6 ml (bleu avec bande rouge)

1 2 3 4 5

- **Peser le placenta si possible (dans le sac plastique)**
- **Remplir la fiche de transmission des prélèvements et y coller l'étiquette Elfe « reserve »**
- **Remplir le bordereau des étiquettes**
  - Nom, Nom Jeune fille prénom et date de naissance de la mère, nom, prénom, date de naissance de l'enfant, et poids du placenta (petite planche mère - enfant)
  - Date et heure des prélèvements (grande planche prélèvements)
- **Coller dans le cahier d'enregistrement Elfe**
  - L'étiquette d'hospitalisation de la mère dans la case « Nom de la mère »
  - Une étiquette Elfe Mère dans la case « Etiquette Elfe »
  - Une étiquette Enfant (avec le poids du placenta noté) dans la case « prénom de l'enfant »
- **Coller les étiquettes sur les tubes**

(ATTENTION : si jumeaux, 5 tubes et 5 étiquettes supplémentaires pour le sang de cordon)

- **Mettre la petite planche des étiquettes mère – enfant remplie dans le cahier d'enregistrement Elfe des naissances (enveloppe à la fin du cahier)**
- **Mettre la grande planche des étiquettes prélèvements remplie et la fiche de transmission des prélèvements sang et urines remplie sur le sac zip avec les tubes de sang**
- **Mettre immédiatement les prélèvements de sang et d'urine au réfrigérateur à +4°C**
  - Un sac zip avec les tubes de sang et la planche des étiquettes prélèvements agrafée avec la fiche de transmission
  - Un sac zip avec les urines

Annexe 5 - Lettre d'information de la mère

LETTRE D'INFORMATION POUR LA MERE

Étude longitudinale française depuis l'enfance

GRANDIR EN FRANCE
OCTOBRE 2007

Elfe : La première grande étude sur le devenir des enfants en France

Madame,

Nous vous proposons de participer à une étude "pilote" ELFE qui se déroule en octobre 2007 en Ile-de-France (Seine-Saint-Denis) et en Rhône-Alpes (Ardèche, Loire, Savoie et Isère), afin de tester la mise en place de l'étude sur les aspects techniques et logistiques.

L'étude en vraie grandeur aura lieu en 2009 et concernera 20 000 enfants suivis de la naissance à l'âge adulte. Le projet Elfe a été conçu afin de contribuer à une meilleure connaissance du développement de l'enfant en tenant compte de son environnement physique et social. Un des principaux objectifs du projet Elfe sera d'étudier les différents facteurs en interaction tout au long du devenir de l'enfant jusqu'à l'âge adulte (facteurs familiaux, sociaux, environnementaux, scolaires, comportementaux, sanitaires, nutritionnels …) et de comprendre l'impact des situations traversées durant l'enfance.

La première étape de l'étude Elfe débutera à la maternité et sera réalisée en association avec une Étude nationale périnatale. Ces études nationales ont lieu tous les trois à cinq ans, à la demande du ministère chargé de la Santé ; elles permettent de suivre l'évolution de l'état de santé et des soins à la naissance de l'enfant en France.

Les résultats aideront les pouvoirs publics à mettre en place des politiques familiales et de santé pour les enfants.

Comme chaque enfant est unique, la qualité des résultats de l'étude dépend de votre participation avec celle de votre enfant.

Vous avez reçu une brochure Elfe puis un professionnel de santé est venu vous présenter l'étude, maintenant vous pouvez choisir de vous joindre à ce grand projet.

En quoi consiste votre participation?

1. Un premier contact a lieu maintenant à la maternité

A la maternité, nous vous demandons de bien vouloir répondre à quelques questions concernant votre situation familiale et le déroulement de votre grossesse, dans le cadre de l'Étude nationale périnatale.

Si vous êtes d'accord, nous vous proposons avec Elfe de compléter ce recueil par une description de vos habitudes alimentaires et domestiques lors de la grossesse dans un auto-questionnaire (30 minutes) que vous laisserez ensuite à la maternité.
Si vous le permettez, les échantillons d'urines et de sang de cordon recueillis lors de l'accouchement pourront être étudiés à la recherche de marqueurs infectieux (cytomégalovirus, toxoplasmose), de nutriments (bilan lipidique, vitaminique) et de polluants environnementaux (métaux, pesticides). Le recueil de lait (marqueurs nutritionnels et environnementaux) et d'une mèche de vos cheveux (mercure) vous sera également proposé pour compléter ces recherches.

2. Nous vous proposons ensuite un entretien à votre domicile en décembre 2007

Si vous le voulez bien, une personne de l'Institut national de la statistique et des études économiques (Insee) prendra contact avec vous pour fixer ce rendez-vous. Nous vous demanderons alors de décrire votre contexte familial, votre environnement de vie et de santé en répondant à un questionnaire pendant 1h.

Dans certains logements choisis au hasard, nous vous proposerons de réaliser des mesures environnementales grâce à un appareil de mesure discret. Celui-ci restera en place environ trois mois.
Si votre logement est sélectionné, une plaquette d'informations concernant ces prélèvements vous sera transmise par la personne de l'Insee.

Si le père de votre enfant est d'accord, il participera à un entretien téléphonique d'une durée de 20 minutes réalisée par une personne de l'Insee. Le rendez-vous sera fixé à sa convenance.

3. **Au premier anniversaire de votre enfant (octobre 2008), il vous sera proposé de répondre à un questionnaire téléphonique (45 minutes). Nous vous proposerons de continuer à participer dans cette étude pilote et vous expliquerons alors en quoi pourra constituer votre implication.**

Les résultats globaux de cette première étude pilote vous seront communiqués par courrier au cours de l'année 2008.

Quels sont vos droits ?

Votre participation et celle de votre enfant à cette étude sont entièrement volontaires.

Vous serez informée au fur et à mesure du déroulement de l'étude.

Vous pouvez décider de ne pas participer ou de vous retirer de l'étude à n'importe quel moment, pour n'importe quelle raison, indépendamment de l'avis du père de votre enfant, et sans aucun préjudice. Votre décision n'aura aucune influence sur la qualité de vos relations à venir avec les professionnels de santé.

Confidentialité et protection de données à caractère personnel

La grande quantité d'informations rassemblées et leur nature personnelle imposent la plus grande vigilance quant aux conditions de recueil et de traitement des données.

Toutes les données recueillies dans le cadre de cette étude resteront strictement confidentielles. Elles feront l'objet d'un traitement informatisé et anonymisé à l'Institut national d'études démographiques (Ined). Elles seront conservées pendant une durée indéterminée.

Le traitement informatique de ces données a fait l'objet d'une demande d'avis auprès du Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS), dont l'avis a été rendu

favorable le 27 juin 07, et d'une demande d'autorisation auprès du Comité de Protection des Personnes qui a émis un avis favorable le 2 juillet 2007, ainsi qu'une demande auprès de la Commission nationale de l'informatique et des libertés (Cnil).

Vous gardez un droit d'accès, de modification sur vos données enregistrées jusqu'à leur anonymisation (environ dans 3 mois) et un droit d'opposition à tout moment de l'étude, selon la loi "Informatique et Libertés" (article 40) du 7 août 2004. Ces droits pourront s'exercer auprès de l'Ined.

En cas de nécessité et durant toute la durée de l'étude vous pouvez poser les questions que vous souhaitez aux personnes responsables à l'Ined.

Contacts : Bureau Elfe : +33(0)1.56.06.21.41/01
bureau-elfe@ined.fr

Adresse : GIS-ELFE – INED
133 Bd Davout - 75980 Paris Cedex 20

Annexe 6 - Fiche de transmission des prélèvements

FICHE DE TRANSMISSION DES PRELEVEMENTS
ELFE PILOTE OCTOBRE 2007

SANG DE CORDON ET URINES

Coller une étiquette ELFE :
(Etiquette « réserve »)

Partie à remplir par la sage femme de bloc

NOM DE LA MATERNITE : ……N° FINESS : /__/__/__/__/__/__/__/__/__/

Prélèvements réalisés : **Sang** : Oui ❑ Non ❑ Nombre de tubes : **/__//5**

Urines : Oui ❑ Non ❑

Date prélèvement sang : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Date prélèvement urines : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Partie à remplir par la sage femme référente

TRANSPORT DES PRELEVEMENTS :

Prélèvements remis au transporteur par : nom prénom : ……..

Nom du transporteur : ……..…

Date : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Les 2 types de prélèvements sont-ils remis au même moment : Oui ❑ Non ❑

Partie à remplir par l'EFS (Etablissement français de sang)

CENTRE DE DISTRIBUTION / PREPARATION EFS DE : ……

Réception des prélèvements :

Prélèvements réceptionnés par (nom prénom) : ……

Date de réception : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Traitement et aliquotage des prélèvements :

Date des aliquotages : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Stockage à la température de - 80°C :

Date : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Les cheveux son stockés à température ambiante

OBERVATIONS GENERALES : problèmes survenus, contraintes chaîne de froid, étiquetage,…… signaler à l'InVS

……
……
……
……
……
…….. ..

Fiche à transmettre à l'équipe projet ELFE par l'EFS

Annexe 6 bis - Fiche de transmission des prélèvements

FICHE DE TRANSMISSION DES PRELEVEMENTS
ELFE PILOTE OCTOBRE 2007

LAIT MATERNEL ET CHEVEUX

Coller une étiquette ELFE :
(Etiquette « réserve »)

NOM DE LA MATERNITE : ……N° FINESS : /__/__/__/__/__/__/__/__/__/

Partie à remplir par la sage femme enquêtrice

Prélèvements réalisés : **Lait maternel** : Oui ❑ Non ❑ Nombre de tubes : /__/ /2

Cheveux : Oui ❑ Non ❑

Date prélèvement lait : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Date prélèvement cheveux : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Partie à remplir par la sage femme référente

TRANSPORT DES PRELEVEMENTS :

Prélèvements remis au transporteur par : nom prénom : ……..

Nom du transporteur : ……..…

Date : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Les 2 types de prélèvements sont-ils remis au même moment : Oui ❑ Non ❑

Partie à remplir par l'EFS (Etablissement français de sang)

CENTRE DE DISTRIBUTION / PREPARATION EFS DE : ……

Réception des prélèvements :

Prélèvements réceptionnés par (nom prénom) : ……

Date de réception : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Aliquotage du prélèvement de lait :

Date d'aliquotage : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

Stockage à la température de - 80°C du lait :

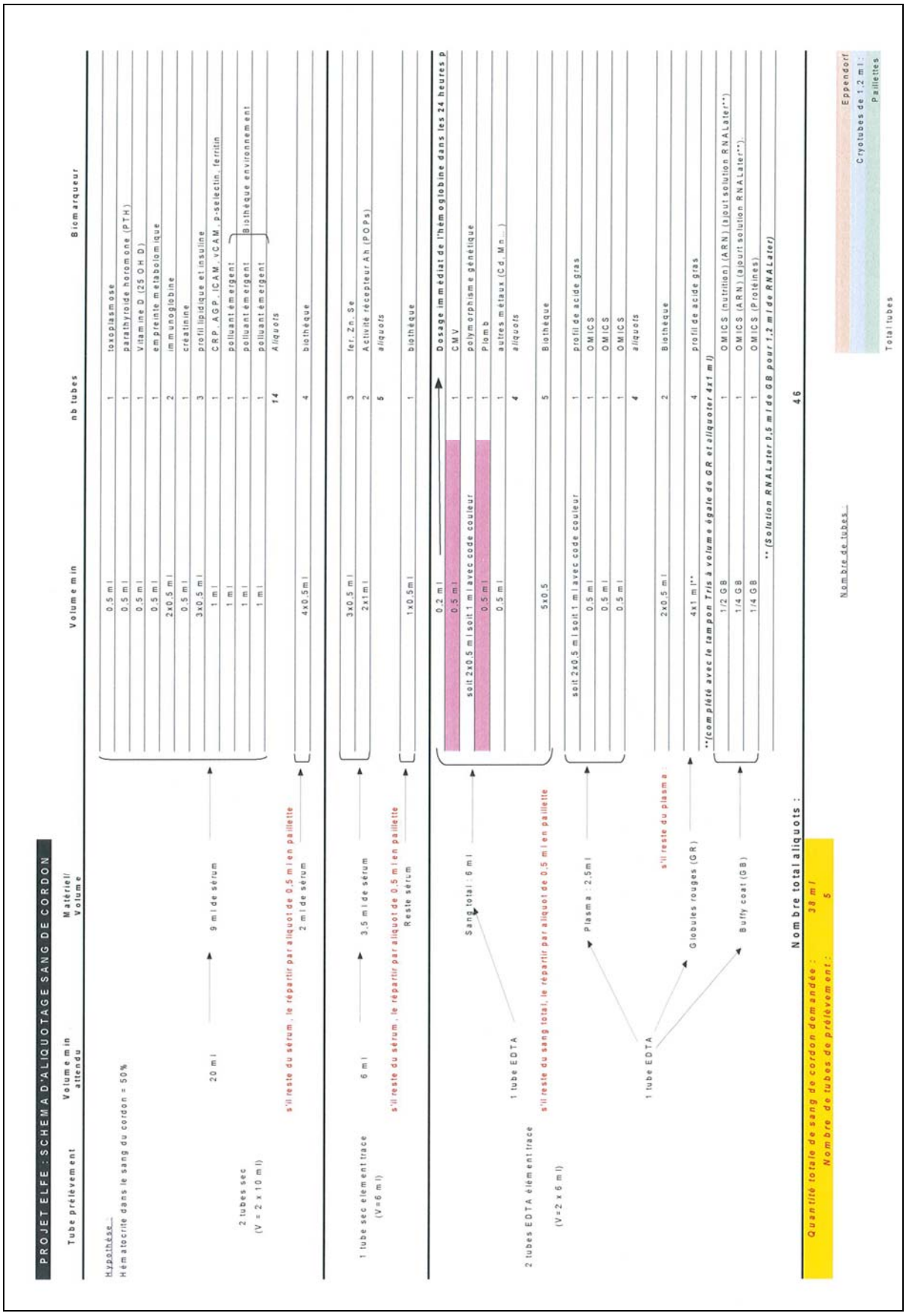
Date : /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/ Heure : /__/__/ h /__/__/ min

OBERVATIONS GENERALES : problèmes survenus, contraintes chaîne de froid, étiquetage,…. signaler à l'InVS

……
……
……
……
……
…… ..

Fiche à transmettre à l'équipe projet ELFE par l'EFS

Annexe 7 - Schéma d'aliquotage du pilote 2007


PROJET ELFE : SCHEMA D'ALIQUOTAGE SANG DE CORDON
Tube prélèvement
Volume min attendu
Matériel/ Volume
Volume min
nb tubes
Biomarqueur
Hypothèse :
Hématocrite dans le sang du cordon = 50%
2 tubes sec (V = 2 x 10 ml)
20 ml
9 ml de sérum
0.5 ml 1 toxoplasmose
0.5 ml 1 parathyroïde horomone (PTH)
0.5 ml 1 Vitamine D (25 OH D)
0.5 ml 1 empreinte métabolomique
2x0.5 ml 2 immunoglobine
0.5 ml 1 créatinine
3x0.5 ml 3 profil lipidique et insuline
1 ml 1 C.R.P., A.G.P., ICAM., vCAM., p-selectin, ferritin
1 ml 1 polluant émergent
1 ml 1 polluant émergent Biothèque environnement
1 ml 1 polluant émergent
14 Aliquots
s'il reste du sérum, le répartir par aliquot de 0.5 ml en paillette
2 ml de sérum
4x0.5 ml 4 biothèque
1 tube sec élement trace (V=6 ml)
6 ml
3.5 ml de sérum
3x0.5 ml 3 fer, Zn, Se
2x1 ml 2 Activité récepteur Ah (POPs)
5 aliquots
s'il reste du sérum, le répartir par aliquot de 0.5 ml en paillette
Reste sérum
1x0.5 ml 1 biothèque
2 tubes EDTA élément trace (V=2 x 6 ml)
1 tube EDTA
Sang total : 6 ml
0.2 ml Dosage immédiat de l'hémoglobine dans les 24 heures p
0.5 ml 1 CMV
soit 2x0.5 ml soit 1 ml avec code couleur 1 polymorphisme génétique
0.5 ml 1 Plomb
0.5 ml 1 autres métaux (Cd, Mn...)
4 aliquots
5x0.5 5 Biothèque
s'il reste du sang total, le répartir par aliquot de 0.5 ml en paillette
Plasma : 2.5 ml
soit 2x0.5 ml soit 1 ml avec code couleur 1 profil de acide gras
0.5 ml 1 OMICS
0.5 ml 1 OMICS
0.5 ml 1 OMICS
4 aliquots
1 tube EDTA
s'il reste du plasma :
Globules rouges (GR)
2x0.5 ml 2 Biothèque
4x1 ml** 4 profil de acide gras
**(complété avec le tampon Tris à volume égale de GR et aliquoter 4x1 ml)
Buffy coat (GB)
1/2 GB 1 OMICS (nutrition) (ARN) (ajout solution RNALater**)
1/4 GB 1 OMICS (ARN) (ajout solution RNALater**)
1/4 GB 1 OMICS (Protéines)
** (Solution RNALater 0.5 ml de GB pour 1.2 ml de RNALater)
Nombre total aliquots : 46
Quantité totale de sang de cordon demandée : 38 ml
Nombre de tubes de prélèvement : 5
Nombre de tubes
Eppendorf
Cryotubes de 1.2 ml : Paillettes
Total tubes

Annexe 7 bis - Schéma d'aliquotage du pilote 2007

SCHEMA D'ALIQUOTAGE URINES

Tube	Prélèvement Volume	Volume	Quantité	Biomarqueur	Type	Etiquette
Flacon à urines haute densité (V=250 ml)	150 ml →	10 ml	1	cotinine	Cryotube	ELFE-U10
		10 ml	1	phtalates	Cryotube	ELFE-U10
		10 ml	1	Biothèque (chimique)	Cryotube	ELFE-U10
		10 ml	2	organochlorés	Cryotube	ELFE-U30
		10 ml	2	organophosphorés	Cryotube	ELFE-Réserve
		10 ml	2	pyréthrinoïdes	Cryotube	ELFE-Réserve
		10 ml	1	organoétains	Cryotube	ELFE-GR-EDTA
		10 ml	4	biothèque	Cryotube	ELFE-U-BIO
		Nombre tubes	*14*			

SCHEMA D'ALIQUOTAGE LAIT

Tube	Prélèvement Volume	Volume	Quantité	Biomarqueur		Etiquette
MATERNITE						
1 tube de prélèvement (V=10 ml)	10 ml →	1 ml	5	Analyse lipides et proteines (approche protéomique)	Cryotube	ELFE-S-TS
		1 ml	1	CD14	Cryotube	ELFE-S-TS
		1 ml	4	Biothèque (chimique)	Cryotube	(4)ELFE-S-TS-B
Si 1 tube supplémentaire		1 ml	2	Biothèque	Cryotube	(1)ELFE-S-TS-B + (1)ELFE-ST-EDTA
		Nombre tubes	**12**			
DOMICILE						
Flacon en verre ambré (V=250 ml)	170 ml →	10 ml	3	POP (PBDE et PCB)	Cryotube	ELFE-L10
		10 ml	3	POP (PFOS et PFOA)	Cryotube	ELFE-L10
		10 ml	3	Biothèque (alimentation)	Cryotube	ELFE-L10
		10 ml	1	Alkylphénols	Cryotube	ELFE-L10
		10 ml	2	Adiponectin	Cryotube	ELFE-L10
		10 ml	2	Biothèque	Cryotube	ELFE-L10
		10 ml	2	Biothèque	Cryotube	ELFE-L10
		Nombre tubes	*16*			

Enseignements de la collecte biologique en maternité de l'étude pilote Elfe

Octobre 2007

La cohorte Elfe (Étude longitudinale française depuis l'enfance) permettra d'analyser les expositions périnatales aux polluants environnementaux, nutritionnels ou infectieux et d'évaluer leur impact sur la santé de 20 000 enfants, nés en 2011 et suivis jusqu'à l'âge adulte. La collecte biologique en maternité est une étape cruciale pour évaluer ces expositions. Une étude pilote a été réalisée en octobre 2007 en sur 500 naissances, montrant un taux de réalisation de 80 % des prélèvements biologiques en maternité sur le sang de cordon, le lait maternel, les urines et les cheveux de la mère. Les échantillons ont été recueillis par les sages femmes et transportés deux fois par jour à +4 °C jusqu'aux deux centres EFS, où ils ont été aliquotés et stockés à -80 °C. Ce pilote a permis de valider les procédures de collecte et de mise en biobanque des échantillons et de tirer des enseignements logistiques, organisationnels et scientifiques pour dimensionner l'étude au niveau national. Ces enseignements concernent le choix du matériel, l'amélioration des consignes, l'optimisation des règles d'aliquotage et de transport ; la mise en place d'une coordination régionale ; la rémunération des sages femmes ainsi que l'optimisation du plan de sondage. L'étude a, par ailleurs, permis de sélectionner les matrices pertinentes de façon quantitative (volumes recueillis, nombre de sujets) et qualitative (premiers dosages) sur le sang de cordon, les urines maternelles, les cheveux et le lait en maternité, d'en abandonner d'autres (lait à domicile) ou de proposer d'autres pistes (sang veineux maternel, méconium, tissu placentaire) et en ce sens, est une source riche d'enseignements pour les études de biosurveillance à venir.

Mots clés : collecte biologique, cohorte de naissance, facteurs préanalytiques, biobanque, qualité des échantillons

Teaching of the collect of biological samples at the maternity based on the pilot study Elfe

October 2007

The ELFE cohort (French Longitudinal Study of Children) will contribute to analyze perinatal exposures to environmental, nutritional or infectious pollutants and evaluate their impact on the health of 20,000 children born in 2011 and followed-up into adulthood. The collect of biological samples at the maternity level is a crucial step to evaluate these exposures. A pilot study was conducted in October 2007 on 500 births, showing a completion rate of 80% biological samples on cord blood, the mother's breast milk, urine and hair. Samples were collected by midwives and transported twice a day at +4°C to the two EFS centers, where they were aliquoted and stored at -80°C. This pilot contributed to validate the collection and stockage of samples in biobanks, and learn lessons from the logistical, organizational and scientific aspects to balance the study at national level. These teachings concern the choice of equipment, improved instructions, and optimization of aliquoting and transport rules; the implementation of regional coordination; the remuneration of midwives and the optimization of the sampling plan. In addition, the study contributed to select relevant matrices not only quantitatively (volumes collected, number of subjects), but also qualitatively (first dosages) on cord blood, maternal urine, hair and milk in maternity, and to give up others (milk at home) or propose other possibilities (maternal venous blood, meconium, placental tissue). The study is in this sense a source of valuable lessons for future biomonitoring studies.

Citation suggérée :
Vandentorren S, Oleko A. Enseignements de la collecte biologique en maternité de l'étude pilote Elfe, octobre 2007 - Rapport final. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2011. 56 p. Disponible à partir de l'URL : http://www.invs.sante.fr

INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE
12 rue du Val d'Osne
94 415 Saint-Maurice Cedex France
Tél. : 33 (0)1 41 79 67 00
Fax : 33 (0)1 41 79 67 67
www.invs.sante.fr

ISSN : 1958-9719
ISBN-NET : 978-2-11-099459-2